

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología
(Farmacognosia y Farmacología Experimental)



PRINCIPIOS ANTIINFLAMATORIOS DE
Teucrium buxifolium Schreber

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Belén Fernández Puntero

Directores

Irene Iglesias Peinado

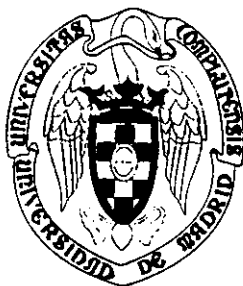
Ángel María Villar del Fresno

Madrid

ISBN: 978-84-8466-848-0

© María Belén Fernández Puntero, 1994

TESIS DOCTORAL



**PRINCIPIOS ANTIINFLAMATORIOS DE
Teucrium buxifolium Schreber**

María Belén Fernández Puntero

**Directores: Angel María Villar del Fresno
Irene Iglesias Peinado**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
1993**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
(FARMACOLOGIA GENERAL Y APLICADA
FARMACODINAMIA. FARMACOGNOSIA).

ANGEL MARÍA VILLAR DEL FRESNO, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, E IRENE IGLESIAS PEINADO, PROFESORA TITULAR DEL CITADO DEPARTAMENTO, COMO DIRECTORES

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "PRINCIPIOS ANTIINFLAMATORIOS DE *Teucrium buxifolium* Schreber", presentada por María Belén Fernández Puntero, ha sido realizada en este Departamento bajo su inmediata dirección y asesoramiento, reuniendo todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor en Farmacia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, se autoriza su presentación para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente en Madrid, Diciembre de 1993.

Prof. Dr. Angel Ma Villar
Director de la Tesis

Prof. Dra. Irene Iglesias
Directora de la Tesis

*Lo que estamos haciendo es sólo una gota en el océano,
pero si esta gota no estuviera, pienso que al océano
le faltaría algo.*

Madre Teresa de Calcuta

*A mi familia, a quienes tantas horas
de dedicación he tenido que robar*

A la memoria de mi abuelete

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada
por una beca de Formación de Personal Investigador
de la Universidad Complutense de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Son estas las últimas páginas que escribo - por cierto, las más difíciles - y curiosamente, casi las primeras de la Tesis, y claro, no sólo me refiero al orden, sino a su importancia, porque después de tanta "ciencia", este trabajo estaría incompleto si hubiera olvidado el componente humano del mismo.

Atrás quedan tantas cosas... ese primer año de mucha bibliografía y poca experimentación, por no tener la planta; las obras del Departamento, mil y un traslados de la colección de drogas, reactivos y demás; después, año tras año, "en busca de la planta perdida", arriesgadas incursiones en el monte y casi escaladas, y las fotos de Carol, con trípode incluido; aquel primer lote de animales con Sagrario, de la mano de Irene y Juana; los primeros "cacharreos" con Karla; aquella visita al Clínico con Paloma, cuando me pinché con la carragenina; el llegar tan tarde a casa y la infinita paciencia de mi familia, y la comprensión que tuve que pedirles; las primeras columnas con D. Angel, y esas otras que tanto gustaban a Sole, y un millar de tubos de ensayo que limpiar -¿sólo un millar, Carmen?--; pero ¿y la alegría de mis primeros cristalitos?, claro que tantas cromatografías, con manchas y más manchas, si, si, muy bonitas pero tantas... y no era pesimismo, aunque Irene siempre me decía lo contrario; y no digamos nada del pletismómetro, ¿verdad Carmencita?; claro, que los "teucrines" también se las trajeron, y si no que se lo digan a Jesús; y las prácticas, los exámenes, los congresos y el club de los "expertitos" y... bueno, tantas cosas.

Durante esas largas horas compartidas, mucho he aprendido y por eso, mucho tengo que agradecer y espero ser capaz de reflejar en estas líneas, al menos, una pequeña parte de mi eterno agradecimiento hacia todos vosotros.

Vaya mi más sincero y afectuoso reconocimiento a mi director de Tesis y maestro, Dr. Angel M^a Villar del Fresno, porque me ha proporcionado usted la oportunidad de realizar uno de mis sueños, vivir la investigación; por lo mucho que de usted he aprendido, por su interés y continua dedicación, en todo momento, sin importar la hora o si se trataba de un día de vacaciones de verano o Navidad. Yo estaba allí y usted junto a mi.

De todo corazón quiero expresar mi agradecimiento a mi directora de Tesis, la Dra. Irene Iglesias, por la confianza sin límites que pusiste en mi desde el primer día, ayudándome así a afianzar una valiosa seguridad en mi misma, por tu inestimable apoyo científico y sobre todo humano, que no olvidaré nunca.

Quiero también dejar constancia de mi gratitud a la desinteresada colaboración del Dr. Serafín Valverde y Dr. Jesús Sanz, en la difícil tarea de la elucidación estructural, por su exquisita amabilidad y paciencia; así como a la Dra. Paloma Cantó y Dr. José Pizarro, que en todo momento me ofrecieron su ayuda y consejos en la clasificación botánica.

Contigo Carolina tengo una deuda imposible de pagar, por tu grandiosa amistad sin fronteras, tu apoyo y cariño, y por la admiración y respeto que siempre mostraste por la constancia y dedicación que este trabajo supuso.

El compartir los buenos y malos ratos, hasta altas horas de la noche, la desesperación y la alegría, la ayuda, la paciencia, el estímulo, todo eso y más, en una palabra vuestra amistad, eso es lo quiero agradeceros a ti Karla, y especialmente a ti Jesús, por vuestro enorme cariño.

Por supuesto, nunca podré olvidar a todos y cada uno de los miembros de este Departamento, que me proporcionásteis tan agradable ambiente, haciéndome sentir como en casa, espero me sabréis perdonar que no caiga en la tentación de nombraros a todos.

Y a mi familia... no os diré más que este trabajo a vosotros va enteramente dedicado.



Teucrium buxifolium Schreber

CLAVE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	Acido araquidónico
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
AR	Artritis reumatoidea
CD	Dicroísmo circular
CLC	Cromatografía líquida en columna
CMC	Carboximetilcelulosa
CO	Ciclooxigenasa
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELAM-1	Molécula de adhesión endotelio-leucocitos
ES	Error standard
FPP	Farnesil pirofosfato
GFPP	Geranil farnesil pirofosfato
GGPP	Geranil geranil pirofosfato
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
GPP	Geranil pirofosfato
HETE	Acidos hidroxiicosatetraenoicos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular
IFN	Interferon
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento insulín-like
IL	Interleukina
IPP	Isopentenil pirofosfato
IR	Infrarrojo
IU	Índice de ulceración
iv	Intravenosa
LO	Lipoxigenasa
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Leucotrienos
M-CSF	Factor estimulador de crecimiento para macrófagos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MPLC	Cromatografía líquida de media presión
NOE	Nuclear Overhauser effects
OPLC	Cromatografía en capa fina bajo presión
PAF	Factor de agregación plaquetaria
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandinas
PGI ₂	Prostaciclina
PLA ₂	Fosfolipasa
PMN	Polimorfonucleares
PPP	Poliprenil pirofosfato
p.o.	per osmos
RL	Radicales libres
RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
SOD	Superóxido dismutasa
TGF-β	Factor de crecimiento celular
TLC	Cromatografía en capa fina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TX	Tromboxanos
UV	Ultravioleta
vs.	versus
ΔV	Incremento de volumen
Ø	Diámetro interno

ÍNDICE TEMÁTICO

ÍNDICE TEMÁTICO

JUSTIFICACIÓN	5
ESTUDIO BOTÁNICO	11
TAXONOMÍA DE <i>Teucrium buxifolium</i>	15
CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	17
ESTUDIO FITOQUÍMICO	25
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA FITOQUÍMICA DEL GÉNERO	29
MATERIAL Y MÉTODOS	31
TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	31
SCREENING FITOQUÍMICO DE <i>Teucrium buxifolium</i>	37
ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL SCREENING FITOQUÍMICO	129
ESTUDIO FARMACOLÓGICO	133
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA FARMACOLOGÍA DEL GÉNERO	137
INFLAMACIÓN	147
CONSIDERACIONES GENERALES	147
MATERIAL Y MÉTODOS: ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE <i>Teucrium buxifolium</i>	177
ANÁLISIS DE RESULTADOS	203
ÚLCERA	207
CONSIDERACIONES GENERALES	207
MATERIAL Y MÉTODOS: ACTIV. ANTIÚLCEROSA Y CITOPROTECTORA DE <i>Teucrium buxifolium</i>	223
ANÁLISIS DE RESULTADOS	243
AI SLAMIENTO DE PRINCIPIOS ACTIVOS	247
TÉCNICAS CROMATOGRAFICAS	251
CONSIDERACIONES GENERALES	251
MATERIAL Y MÉTODOS: FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE <i>Teucrium buxifolium</i>	265
ANÁLISIS DE RESULTADOS	287
TÉCNICAS DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	289
CONSIDERACIONES GENERALES	289
MATERIAL Y MÉTODOS: ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE FRACCIONES DE <i>Teucrium buxifolium</i>	293
ANÁLISIS DE RESULTADOS	337
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	341
CONCLUSIONES	359
BIBLIOGRAFÍA	365
APÉNDICE I: OBRAS DE FRECUENTE CONSULTA	401
APÉNDICE II: TESIS DE LICENCIATURA Y DOCTORALES	403

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

En la lucha contra el dolor y la enfermedad, tan antigua como la Historia de la Humanidad, el hombre ha tratado siempre de mejorar su calidad de vida y retrasar la muerte, recurriendo para ello a todos los medios a su alcance y aplicando, por tanto, los conocimientos que sobre la Naturaleza ha ido adquiriendo a lo largo del tiempo.

El papel que la Medicina Natural ha desempeñado en esta batalla ha sido siempre fundamental, en un principio como origen único de recursos terapéuticos, para pasar posteriormente a ser la fuente de inspiración de los compuestos de síntesis.

Pero ello no implica que su uso se haya visto oscurecido por los grandes avances que la Ciencia experimenta, ya que por un lado, es prácticamente ilimitado el arsenal terapéutico que aún ofrece la Naturaleza, tanto en sus formas aún no estudiadas, como en aquellas de las que ya se dispone de un conocimiento exhaustivo, constituyendo la medicina popular el recurso terapéutico primordial de muchos países en los que el desarrollo tecnológico aún es restringido.

Por otro lado, el resurgimiento que el empleo de las plantas medicinales está viviendo hoy en día en los países avanzados, es una de las razones que ha impulsado a la O.M.S. a promover el conocimiento científico y consecuente uso de la terapéutica vegetal tradicional, lo que conlleva la búsqueda de nuevos principios activos de origen natural. Este interés se debe también al conocido hecho de una menor incidencia de efectos secundarios por parte de estos principios activos, y por supuesto, a la necesidad de corroborar y justificar el uso popular que se hace de miles de especies vegetales, a las que se atribuyen propiedades curativas.

Infinidad de procesos patológicos cursan con síntomas inflamatorios, y debido al carácter incapacitante de los mismos, el descubrimiento de nuevos principios activos de origen natural, paliativos de dicha sintomatología, constituye una línea de trabajo fuertemente consolidada en el Departamento de Farmacología de esta Facultad de Farmacia. Más aún, es objetivo prioritario el hallazgo de una actividad antiinflamatoria, que al

mismo tiempo carezca del potencial gastroerosivo que generalmente acompaña a los antiinflamatorios no esteroídicos, tan profusamente empleados en la terapéutica actual, con el fin no sólo de ampliar el horizonte terapéutico ya existente, sino además aportando el beneficio de una disminución de los efectos secundarios inherentes a dicho grupo farmacológico.

Como fruto de estas investigaciones, el equipo del Prof. Angel Ma Villar del Fresno, ha llegado al aislamiento de principios naturales de diversa naturaleza química, dotados de actividad antiinflamatoria y, algunos de ellos, no ulcógenos [2,4,5,366,368; Apéndice II: Tesis 1,5,7,10].

Por ello, y encuadrado en este marco de investigación, se abordó el estudio de la especie vegetal *Teucrium buxifolium* Schreber, endemismo valenciano de uso en medicina tradicional, en el tratamiento de afecciones reumáticas y todo tipo de inflamaciones.

Esta especie demostró, en ensayos preliminares [9], una notable actividad antiinflamatoria, con resultados muy prometedores que animan a profundizar en su conocimiento, con el fin de justificar su empleo popular en procesos inflamatorios. Por otro lado, especies afines se utilizan como infusiones digestivas y en el tratamiento de úlceras, por lo que parece viable la posibilidad de que la especie *Teucrium buxifolium* presente una actividad antiinflamatoria no ulcerogénica, siendo conveniente ampliar su estudio farmacológico a nivel gastroduodenal con el objetivo de conocer su acción a nivel de la mucosa gástrica.

Una vez justificado el empleo popular que se hace de la especie objeto de estudio, es fundamental el aislamiento y caracterización de los principios activos responsables de dicha actividad biológica, en el ánimo de ampliar y mejorar las perspectivas farmacológicas de que se dispone en la actualidad.

En síntesis, los objetivos a cubrir en esta Memoria de Investigación serán los siguientes:

* Revisión bibliográfica de la especie, y en su defecto del género, a nivel botánico, fitoquímico y farmacológico.

* Estudio de la composición cualitativa de la especie, con el fin de iniciar una investigación racionalizada de los principios con actividad biológica.

* Estudio farmacológico: ensayos que corroboren la actividad antiinflamatoria, en fase aguda y crónica, y comprobación de la actividad a nivel gastroduodenal, como antiulceroso y/o citoprotector de mucosa gástrica.

* Fraccionamiento cromatográfico y seguimiento de la actividad de las sucesivas fracciones obtenidas, con el fin de llegar al aislamiento de los principios químicos responsables de la actividad y elucidación de su estructura.

ESTUDIO BOTÁNICO

ESTUDIO BOTÁNICO

TAXONOMÍA DE <i>Teucrium buxifolium</i> Schreber	15
SITUACIÓN TAXONÓMICA	15
Sinonimias	16
CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	17
CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA	17
CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO	17
CARACTERÍSTICAS DE LA SECCIÓN Y SERIE	18
DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE	19
CARACTERÍSTICAS DE LAS SUBESPECIES	21
Subespecie <i>buxifolium</i>	22
Subespecie <i>hifacense</i>	22
Subespecie <i>rivasii</i>	22
FITOSOCIOLOGÍA	23

TAXONOMÍA DE *Teucrium buxifolium* Schreber

La especie *Teucrium buxifolium* constituye un endemismo vegetal íbero-levantino, conocido en la lengua vernácula con el nombre popular de 'teucrí de roca' o 'teucrí de roca', en castellano [15].

El género *Teucrium*, taxonómicamente conflictivo, cuenta con 300 especies, de las cuales 49 se encuentran distribuidas por el continente europeo, fundamentalmente bajo la influencia del clima mediterráneo. Diferencias en las características morfológicas de las inflorescencias y cáliz, así como micromorfológicas (tricomos) y cariológicas, permiten establecer los diversos táxones, y en la actualidad, el amplio campo de la quimiotaxonomía ha permitido un gran avance en la clasificación botánica de éste y otros muchos géneros.

SITUACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica de la especie *Teucrium buxifolium* Schreber se ha llevado a cabo en base a la Flora Europaea [345], revisada por Cronquist [72], ya que este autor compendia la clasificación más actual de los estadios supremos:

TRONCO	<i>Cormophyta</i>
DIVISIÓN	<i>Spermaphyta</i>
SUBDIVISIÓN	<i>Angiospermae</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
SUBCLASE	<i>Asteridae</i>
ORDEN	<i>Lamiales</i>
FAMILIA	<i>Lamiaceae</i>
SUBFAMILIA	<i>Ajugoideae</i>
TRIBU	<i>Teucrieae</i>
GÉNERO	<i>Teucrium</i>
SECCIÓN	<i>Polium</i>
SUBSECCIÓN	<i>Polium</i>
SERIE	<i>Rotundifolia</i>
ESPECIE	<i>buxifolium</i>

Teucrium buxifolium Schreber es una especie vegetal angiosperma perteneciente a la familia *Lamiaceae*, de la tribu 8ª *Teucrieas*, sección *Polium* [345]. Los estudios taxonómicos más recientes que existen sobre esta especie la sitúan en la sección *Polium*, serie *Rotundifolia* [216].

Sinonimias

Teucrium buxifolium Schreber, Pl. Verticill. Unilab.: 27. 1774

= *T. saxatile* Cav., Icon. Descript. tb. 121. 1793

= *T. amplexicaule* Benth. Lab. Gen. sp. 687 (1835)

= *T. petrophyllum* Pau, Pl. Almería: 31. 1925

= *T. buxifolium* Schreber var. *diversifolium* Pau ex Vicioso, Bol. Real. Soc. Españ. Hist. Nat. 16: 141. 1916

= *T. buxifolium* Schreber. var. *fraternum* (= *T. fraternum* S&P ap. Sennen. Pl. d'Espagne nº 5657) Cavanillesia 1: 60-67. 1928

Mientras que en 1902 la especie *Teucrium buxifolium* subespecie *hifacense* viene definida como especie *hifacense* [238], posteriores estudios sobre la flora y vegetación de Alicante [ver Apéndice II: Tesis 8] indican que el *T. buxifolium* Schreb. ssp *buxifolium* Schreb. es igual al *T. buxifolium* Schreb. var *tomentosum* WK. y al *T. saxatile* Cav., localizándose en la región valenciano-levantina, de la cual es endémica. En la Vegetación y Flora de las Regiones Central y Meridional de la Provincia de Murcia, se identifica al *T. buxifolium* Schreb. como *T. saxatile* Cav., hallándose en paredes rocosas verticales, más o menos abruptas, ascendiendo hasta los 1.400m, en todas las montañas de interior y apenas en las elevaciones litorales.

CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE *Teucrium buxifolium* Schreber

CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA

La Familia *Lamiaceae* se define en la Flora Vascular de Andalucía Occidental [78] con las siguientes características:

Arbustos, matas o hierbas perennes o anuales, con aceites esenciales. Tallos de sección cuadrangular. Hojas opuestas, simples, pecioladas o sentadas, sin estípulas. Inflorescencia normalmente en espiga de verticilastros, compuestos por dos cimas dicasiales opuestas protegidas por sendas brácteas. Flores zigomorfas, rara vez actinomorfas, hermafroditas. Cáliz gamo-sépalo con 4 ó 5 lóbulos, frecuentemente bilabiado, a veces con un anillo de pelos en la garganta (carpotegio). Corola gamopétala con 5, rara vez 4 lóbulos, bilabiada, con el labio superior bilobado y el inferior trilobado, a veces con un sólo labio o, más o menos, actinomorfa. Androceo con 4 estambres, normalmente didínamos libres o con 2 estambres libres, epipétalos. Disco (ginóforo) más o menos desarrollado. Ovario súpero, bicarpelar, tetralocular, con un primordio seminal por cavidad. Estilo ginobásico. Fruto tetranúcula, rara vez con núcula carnosa.

CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO

El género *Teucrium* posee la corola sin labio superior y sin el anillo de pelos en el interior del tubo. Se trata de arbustos, matas o hierbas perennes, bienales o anuales. Hojas sentadas o pecioladas, persistentes, a menudo con márgenes marcadamente revolutos. Inflorescencia simple o compuesta, en espiga de verticilastros, a veces, capituliforme, con bracteolas interflorales. Brácteas semejantes a las hojas. Cáliz tubuloso o campanulado, subactinomorfo o bilabiado, a menudo giboso en la base con 5 dientes. Corola más o menos pubescente, con sólo el labio inferior pentalobado, y tubo generalmente más corto que el cáliz. Androceo didínamo, con estambres generalmente exentos; filamentos estaminales curvados. Estilo subterminal. Núculas frecuentemente reticuladas, glabras, pubescentes o papilosas.

Comprende este género más de 100 especies dispersas por varias regiones templadas y cálidas, principalmente por las zonas mediterráneas; algunas por toda Europa; otras por Asia y América; pocas en el África Austral y en Australia; muy raras entre los Trópicos [165]. En la *Flora Europaea* se citan 46 especies del género *Teucrium* [345].

Lázaro e Ibiza [166] cita la tribu *Teucrieas*, que reciben su nombre del rey de Troya, *Teucer*, que describió algunas especies, haciendo referencia a 43 de ellas, de las que Font-Quer destaca algunas por su uso medicinal [98].

En relación con la especie objeto de estudio, existen otras dos entidades del género *Teucrium* muy similares y taxonómicamente aún no bien delimitadas, dependiendo de los autores:

Teucrium hifacense: hoja más grande, redondeada y de bordes dentados.

Teucrium buxifolium: hoja intermedia, grisácea, ovalada y bordes no muy dentados.

Teucrium thymifolium: hoja estrecha, semejante al tomillo, y de tallo más o menos leñoso.

CARACTERÍSTICAS DE LA SECCIÓN Y SERIE

Los táxones relacionados con *Teucrium buxifolium* han sido tradicionalmente incluidos en la sección *Polium* (Miller) Schreber, y la mayor parte de los autores los incluyen en la subsección *Rotundifolia*, dentro de la mencionada sección, siguiendo la propuesta de Cohen [64], aunque Lázaro e Ibiza [166] reúne dichos táxones en la sección *Montanum*, caracterizada por incluir plantas con la inflorescencia capitada y hojas poco o nada revolutas.

La Sección *Polium* concreta matas, frecuentemente, con pelos ramificados; inflorescencia simple o compuesta, capituliforme o formando glómérulos; cáliz subactinomorfo, no giboso.

La Serie *Rotundifolia* se caracteriza y diferencia de las otras series de la sección, por presentar todos sus táxones indumento de pelos sencillos glandulosos o eglandulosos, acompañados en ocasiones de glándulas sentadas. Indumento, que es típico de especies con número cromosomático más bajo ($2n=26$), filogenéticamente poco evolucionadas, posiblemente táxones paloendémicos con cierto carácter *relictual tropical* semejante al que caracteriza a la sección *Chamaedrys*, también presente en la Península Ibérica. Suelen encontrarse en zonas áridas y próximas al mar, son las más olorosas y las de más uso por el vulgo, en infusiones.

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

La primera descripción que existe de la Especie *Teucrium buxifolium* es del año 1774, por I. O. Christiano Daniele Schrebero, en su obra "*Plantarum verticillatarum unilabiatarum. Genera et Species*" [292].

Lázaro e Ibiza [166] la describe como subfruticosa, peloso-pubescente; hojas trasovado-cuneiformes, festoneadas, canescentes por el envés, las florales en la base de las cabezuelas, más largas que las flores; brácteas lanceoladas, enteras; corola blanquecina o rojiza, con el lóbulo inferior trasovado y cóncavo, presentando floración de mayo a julio, en Valencia, Murcia y Almería.

Una descripción más completa nos indica que se trata de una mata subfruticosa de tallos prodecumbentes de 5 a 12cm. Hojas ovales a oblongas, a veces ovado-lanceoladas, planas, las superiores de márgenes algo revolutos, de 6.5 a 7mm de longitud, brevemente pecioladas, enteras o crenadas sólo en el ápice. Cáliz de 7mm, dientes subiguales plano agudos, en ocasiones mucronados. Planta pubescente, a veces tomentoso-blanquecina, de pelos glandulosos.



Detalle de la especie *Teucrium buxifolium*

recolectada en el Castillo de Santa Bárbara, Monte Benacantil (Alicante). Mayo de 1993.

Floración: de mayo a julio.

Características del Biótomo: vive en roquedos calizos del piso termo y mesomediterráneo. Es una planta termófila, con tendencia a xérica, que se desarrolla en las regiones submontana y montana de las sierras alicantinas.

Distribución: Levante peninsular, provincias de Valencia y Alicante.

Variabilidad: se observa variación en la forma del limbo foliar, generalmente entero; aunque, en ocasiones, las hojas del eje floral se encuentren algo crenadas en el ápice, son planas, pero también se revuelven los márgenes, sobre todo en la planta adulta. La variación del indumento permite establecer diferencias entre las especies relacionadas.

CARACTERÍSTICAS DE LAS SUBESPECIES [70]

Es preciso realizar una breve descripción de las subespecies más relacionadas de este taxon, ya que su restringida y cercana distribución (Figura 1), así como las características morfológicas en común, pueden conducir a error en su recolección.

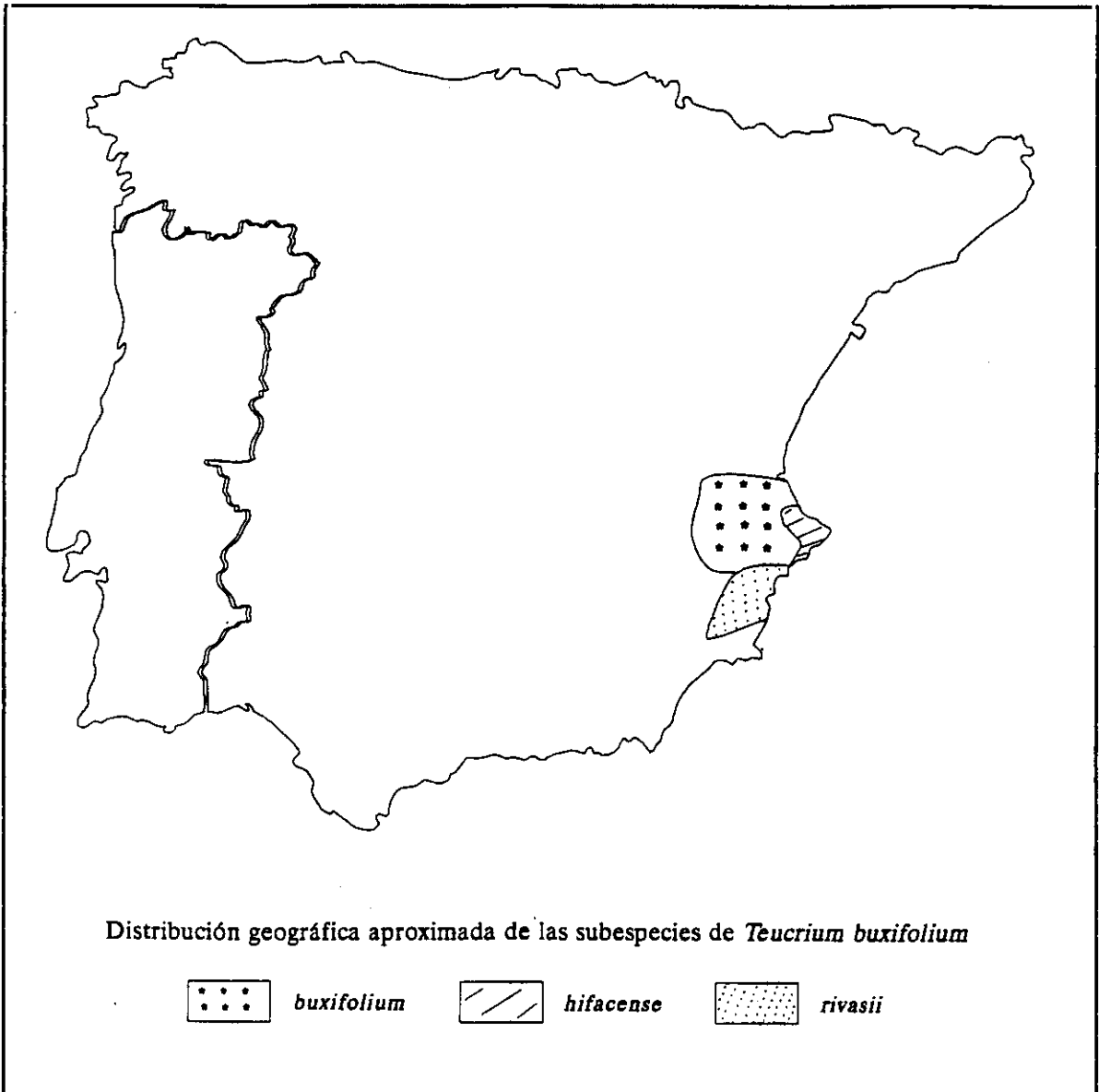


Figura 1.

Subespecie *buxifolium*

Descripción: hojas de tamaño variable, generalmente de unos 10mm de longitud, ovaladas a oval-lanceoladas, planas o algo revolutas en los márgenes, pecioladas, crenadas, con el haz más o menos densamente cubierto de tricomas glandulares y eglandulares, y en el envés cano-tomentoso. Cáliz glandular-pubescente, con tricomas eglandulares más o menos abundantes. Corola rojiza. Florece de marzo a junio.

Ecología: casmófito calcícola, propio de roquedos soleados termo y mesomediterráneos, con óptimo en los *Teucrion buxifolii*.

Distribución: endemismo de las sierras setabenses de baja y media altitud.

Subespecie *hifacense* (Pau) Fernández Casas, Bol.Soc.Brot., ser.2,47:296(1974)

= *T. hifacense* Pau, Bol.Soc.Aragonesa Ci.Nat.,1:30 (1902)

= *T. buxifolium* var. *hifacense* (Pau) O. Boldòs & Vigo, Collect. Bot. (Barcelona) 14:91(1983).

Descripción: hojas de tamaño variable, las superiores a veces hasta de 15mm de longitud, subdeltoideas, muy poco revolutas, subsésiles, crenadas, con el haz cubierto de finos pelos sedosos eglandulares y el envés cano-tomentoso. Tallos con indumento adpreso, tendente a hirtulo. Tubo corolino poco o nada exerto. Cáliz de 10-15mm, glandular-pubescente, con tricomas eglandulares más densos hacia los dientes. Corola blanquecina o rojiza.

Ecología: coloniza roquedos litorales con acusada influencia marítima, en comunidades de *Teucrion buxifolii*.

Distribución: endemismo de área muy reducida, acantonado en las zonas más litorales de las sierras diánicas, sureste del sector Setabense.

Subespecie *rivasii* (Rigual ex Greuter & Burdet) M. B. Crespo, G. Mateo & J. Güemes, comb. & stat. nov.

= *T. rivasii* Rigual, Fl. Veg. Provincia Alicante: 334 (1972), nom. inval.

= *T. buxifolium* var. *glabrescens* (Rigual) O. Boldòs & Vigo en Collect. Bot. (Barcelona) 14:92 (1983), nom. inval.

Descripción: hojas de unos 5mm de longitud, las superiores subdeltoideas, subsésiles, crenadas, claramente revolutas, con el haz cubierto de fina pubescencia eglandular sedosa y el envés cano-tomentoso. Tallos con indumento adpreso, muy densamente enmarañado. Tubo corolino largamente exerto. Cáliz laxamente glandular-pubescente, con escasos tricomas eglandulares. Corola blanquecina o rojiza.

Ecología: casmófito calcícola, propio de las sierras alicantinas, principalmente de matiz continental, en la alianza *Teucrion buxifolii*.

Distribución: endemismo con área centrada en las sierras del sector alicantino, irradiando hacia el murciano.

FITOSOCIOLOGÍA

Existen casi 50 especies vegetales cuya distribución mundial se ciñe casi en exclusiva a la Comunidad Valenciana y territorios colindantes, y una de ellas es el *Teucrium buxifolium*. Esta especie aparece en asociación con otros vegetales, que viven en las fisuras de paredes rocosas calizas, tanto cretácicas como nummulíticas, en armonía con formaciones vegetales correspondientes al tipo de clima y a las condiciones edafológicas, cingles y runares (pedrizas). Se halla dentro de la Clase *Asplenietea Rupestris* Br. Bl. 1934, Orden *Asplenietalia glandulosi* Be. Bl. et Melier 1934, Alianza *Teucrion buxifolii* Riv. Goday 1955.

Dicha alianza se extiende a todo el levante español y, concretamente, la asociación *Jasonia glutinosa et Teucrium buxifolium* por toda la provincia de Alicante y sur de Valencia, en todo su esplendor cuando se sitúa a una altura de aproximadamente 900m sobre el nivel del mar y exposición noreste.

Es propia de los Parques Naturales del Carrascar de la Font Roja, que abarca la Sierra de la Teixereta, sur de la Sierra Mariola, norte del macizo de la Carrasqueta y del Parque del Peñón de Ifac y el Montgó [15].

ESTUDIO FITOQUÍMICO

ESTUDIO FITOQUÍMICO

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA FITOQUÍMICA DEL GÉNERO	29
TERPENOS	30
ACEITES ESENCIALES EN EL GÉNERO <i>Teucrium</i>	35
MONOTERPENOS EN EL GÉNERO <i>Teucrium</i>	38
SESQUITERPENOS EN EL GÉNERO <i>Teucrium</i>	39
NEOCLERODANOS EN EL GÉNERO <i>Teucrium</i>	42
ABIETANOS EN EL GÉNERO <i>Teucrium</i>	73
TRITERPENOS Y ESTEROLES EN EL GÉNERO <i>Teucrium</i>	74
FLAVONOIDES	75
COMPUESTOS FLAVONICOS EN EL GÉNERO <i>Teucrium</i>	76
OTROS COMPUESTOS EN EL GÉNERO <i>Teucrium</i>	79
MATERIAL Y MÉTODOS	81
TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	81
RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	81
DESECACIÓN	82
MOLTURACIÓN	82
CONSERVACIÓN	83
PROCESOS DE EXTRACCIÓN	83
Extracción acuosa	83
Extracción orgánica	84
Rendimiento de los procesos de extracción	85
SCREENING FITOQUÍMICO DE <i>Teucrium buxifolium</i>	87
CARBOHIDRATOS	87
AZÚCARES: libres y combinados	87
MUCÍLAGOS	89
COMPUESTOS FENÓLICOS	90
ACIDOS FENOLES	90
TANINOS	96
CUMARINAS Y SUS HETERÓSIDOS	101
ANTRAQUINONAS Y SUS HETERÓSIDOS	102
FLAVONAS Y HETERÓSIDOS FLAVÓNICOS	106
ANTOCIANIDINAS, ANTOCIANINAS Y LEUCOANTOCIANOS	109
SAPONINAS	112
RESINAS	117
LACTONAS	118
HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	120
HETERÓSIDOS CIANOGENÉTICOS	123
ALCALOIDES	125
ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL SCREENING FITOQUÍMICO	129

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA FITOQUÍMICA DEL GÉNERO *Teucrium*

La escasez de datos con respecto a la composición química de la especie *Teucrium buxifolium*, ha supuesto que la revisión bibliográfica se oriente hacia el género al que pertenece dicha especie.

Acercarse al conocimiento fitoquímico del género *Teucrium* viene motivado, en parte por las dificultades que entraña su clasificación taxonómica y en parte, por las numerosas especies de esta familia y género que son empleadas en la medicina tradicional, despertando así el interés de diversos grupos investigadores. Con respecto a la taxonomía de este género existen extensos trabajos basados en caracteres morfológicos, micromorfológicos y cariológicos, pero las relaciones dentro de las distintas secciones aún son confusas, por lo que es preciso recurrir a los marcadores quimiotaxonómicos. Además, es preciso justificar a nivel científico las aplicaciones terapéuticas que el vulgo les atribuye, mediante el aislamiento, determinación y valoración biológica de sus principios activos.

Quizá los estudios fitoquímicos más antiguos realizados en todo el Reino Vegetal, se refieran a los aceites esenciales, y este género no constituye una excepción, manifestando una gran riqueza en compuestos de naturaleza terpénica, mono y sesquiterpenos formando parte de sus esencias. Así mismo, e independientemente de la composición de los aceites esenciales, han sido aislados otros derivados terpénicos como monoterpenos tipo iridoide, sesquiterpenos del grupo de los guaianos, triterpenos y esteroides, aunque el grupo químico más frecuente del género son los diterpenos, fundamentalmente de esqueleto clerodano, aislados generalmente de la sumidad florida, y del grupo de los abietanos, a partir de la raíz.

Los flavonoides también se hacen presentes en el género, siendo más abundantes las flavonas y apareciendo en algunas especies flavonoles, a pesar de ser compuestos poco usuales en la familia *Lamiaceae*. Los glucósidos, como fenilpropanoides, han constituido también, objeto de interés dentro de este género, así como saponinas, ácidos fenólicos y taninos han sido detectados en diversas especies y de forma excepcional, en una sola especie, se han puesto de manifiesto heterósidos cardiotónicos.

TERPENOS

Bajo el nombre genérico de terpenos se engloba un gran número de compuestos que comparten un mismo origen biosintético en el mevalonato [79,127]. Estos compuestos naturales reciben el nombre de terpenos, terpenoides o isoprenoides, y en 1887 Wallach propone que están formados por la condensación de moléculas de isopreno ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$).

En realidad, el isopreno no es el precursor natural, aunque ha sido detectado como tal en las hojas de *Hammamelis* [79].

El origen de la biosíntesis de terpenos (Figura 2) está en el isopentenil pirofosfato (IPP), formado a través del ácido mevalónico, el cual en el Reino Vegetal y microorganismos, comienza la ruta, activándose una de las ramas de la síntesis, pero nunca todas. Ruzicka ya sospechó que se trata de una ruta biosintética, enzimáticamente regulada.

Dos moléculas de isopentenil pirofosfato se condensan en el geranil pirofosfato (GPP), precursor inmediato de los monoterpenos. El geranil pirofosfato se une a otra molécula de isopentenil, para dar lugar al farnesil pirofosfato (FPP), origen de los sesquiterpenos, que al condensarse con una nueva unidad molecular de isopentenil pirofosfato, origina el geranilgeranil pirofosfato (GGPP), cuya ciclación proporciona el esqueleto diterpenoide. Diferentes combinaciones de estas unidades C_5 , C_{10} y C_{15} dan lugar a los terpenoides de mayor peso molecular, siendo formados los sesterterpenos a partir del geranilfarnesilpirofosfato (GFPP), los triterpenos a partir de 2 unidades de farnesil, tetraterpenos y carotenoides por condensación de dos unidades de geranilgeranil [127], finalizando en el poliprenilpirofosfato (PPP) que da lugar a los poliprenoles y politerpenos (Figura 2).

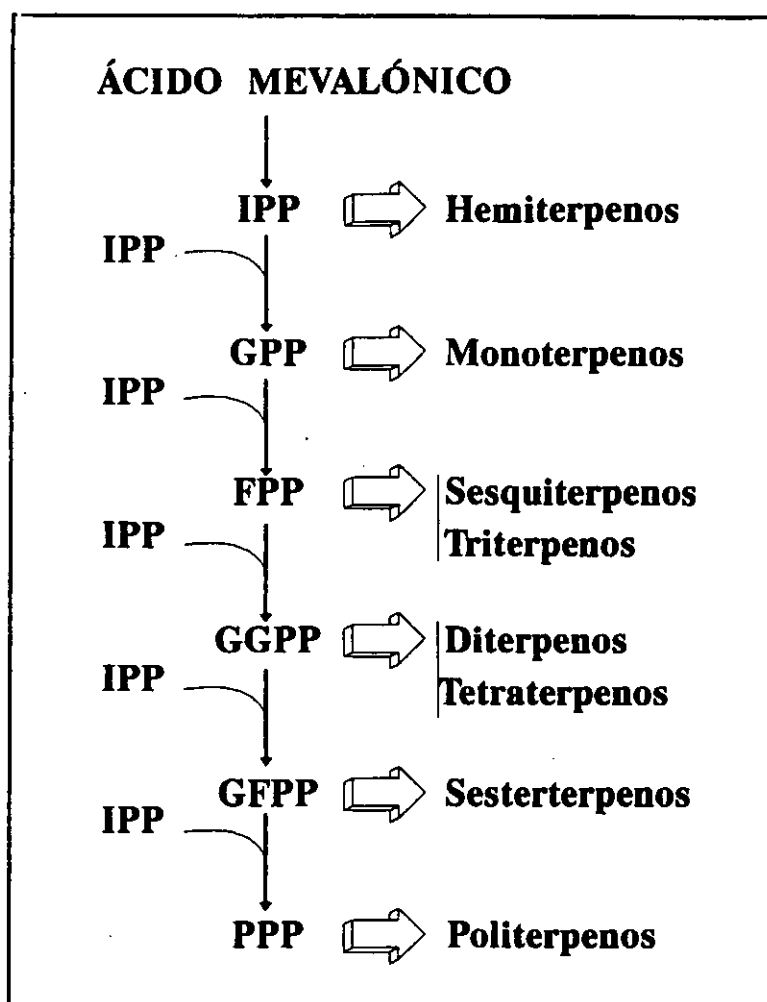


Figura 2. Ruta biosintética de compuestos terpénicos

Sin embargo y a pesar de que el isopreno no es el verdadero precursor, generalmente se habla de condensación de unidades de isopreno, así por ejemplo, se acepta:

Condensación de 2 unidades isoprénicas.....	Monoterpenos
Condensación de 3 unidades isoprénicas.....	Sesquiterpenos
Condensación de 4 unidades isoprénicas.....	Diterpenos
Condensación de 5 unidades isoprénicas.....	Sesterterpenos
Condensación de 6 unidades isoprénicas.....	Triterpenos y Esteroles
Condensación de 8 unidades isoprénicas.....	Carotenoides, etc.

Los terpenos son compuestos naturales de plantas, algas, líquenes, musgos y un subgrupo de los Briófitos, las hepáticas. Se encuentran ampliamente distribuidos en 94 órdenes del Reino Vegetal y, del aproximadamente medio millón de especies vegetales superiores, ha sido investigado quizá no más del 15%. Algunos son de origen microbial y otros se hallan en insectos. Los esteroides pertenecen tanto al Reino Animal, como Vegetal, y pueden observarse en la mayoría de microorganismos.

Algunos de ellos son conocidos desde la antigüedad, como ingredientes de perfumes, narcóticos, jabones, condimentos, drogas y pigmentos, siendo utilizados los aceites esenciales en la Edad Media, como perfumes y en medicina popular; por ejemplo, el alcanfor, de todos conocido, se introdujo en Europa ya en el siglo XI. Aunque su gran interés reside en su empleo en artículos de perfumería y como saborizantes, recientemente se les implica en campos diversos como hormonas sexuales fúngicas, feromonas, y marcadores taxonómicos vegetales. No está aún esclarecido este papel taxonómico, pues además hay que tener en cuenta, que en muchas ocasiones, las plantas toman productos de los hongos que las contaminan, apareciendo terpenos en especies que, en condiciones normales, no existirían. Se les atribuye el papel de reguladores del crecimiento, en los vegetales en que aparecen, considerando a las giberellinas las principales hormonas vegetales del crecimiento. No está demostrado, aunque bastante aceptado, el papel que juegan como agentes de comunicación entre plantas, así como de defensa frente al ataque por insectos. Los mono y sesquiterpenos son responsables del aroma de muchas especies y es bien conocida la contribución de los carotenoides en la coloración de muchos vegetales, participando también como pigmentos accesorios en la fotosíntesis.

Los terpenoides, generalmente, son lipófilos y se localizan en el citoplasma de las células vegetales; extraíbles con éter, cloroformo y éter de petróleo, se separan por CC, con silicagel o alúmina y usando los solventes citados. Las manchas aparecen sin color y no suelen ser sensibles a los reactivos universales de revelado cromatográfico, aunque su presencia puede ponerse de manifiesto en placas de TLC, con H_2SO_4 concentrado o vainillina sulfúrica y posterior calentamiento.

El isomerismo es común entre los terpenoides y suelen aislarse de las plantas formas isoméricas, unidas en parejas. Suelen ser alicíclicos y el anillo ciclohexano, generalmente, adopta la conformación silla, por lo que existe la posibilidad de diferentes conformaciones geométricas, dependiendo de las sustituciones en el anillo. La estereoquímica de los terpenos es, frecuentemente, difícil de determinar, y desde el punto de vista analítico, debe recordarse que la isomerización y reordenamiento estructural dentro de la molécula, puede ocurrir de forma rápida, e incluso, en condiciones suaves, con posibilidad de formación de artefactos.

Muchos terpenoides aparecen *in vivo* como glucósidos, generalmente β -glucósidos, lo que proporciona una mayor solubilidad en agua, facilitando el transporte intra e intercelular, y por tanto su misión protectora del vegetal. Durante la extracción, en condiciones ácidas o por la presencia de glucosidasas endógenas, puede romperse la unión del azúcar, aunque, por lo común, suele resistir a la extracción y la ruptura debe realizarse de forma específica, para obtener, exclusivamente, el esqueleto terpenoide.

MONO Y SESQUITERPENOS

Las esencias son mezclas complejas de terpenos volátiles, mono y sesquiterpenos, y compuestos arénicos derivados del fenilpropano. La diversidad de estructuras terpénicas que presentan, se explica por la elevada reactividad de los carbocationes implicados en los procesos biosintéticos. Los aceites esenciales son los principales responsables del aroma y sabor de numerosas especies, empleadas comercialmente, en la industria del perfume y alimentación.

Los monoterpenos están formados por dos unidades isoprénicas y pueden ser acíclicos, mono o bicíclicos. Dentro de cada grupo se puede tratar de hidrocarburos insaturados, alcoholes, aldehidos o cetonas. También pueden incluirse lactonas como la nepetolactona, de olor peculiarmente atractivo para el gato doméstico [127].

Aunque el interés de estos compuestos es tributario de sus propiedades aromatizantes, se abre un amplio campo de propiedades, aún por desarrollar, como antimicrobiales, antifúngicos y antineoplásicos [79]. Por otro lado, algunos glucósidos monoterpénicos parecen ser activos en la inflamación crónica, fundamentalmente en procesos inflamatorios alérgicos, aunque no inhiben la respuesta inflamatoria no inmune, por lo que se deduce que el esqueleto monoterpénico, estaría más bien asociado a una actividad antialérgica, aunque existe un compuesto monoterpénico, cuyo mecanismo de acción parece relacionado con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

Los sesquiterpenos constituyen un amplio grupo de sustancias (incluidas en el grupo de los terpenos), que aparecen en diferentes organismos. Se conocen más de 100 esqueletos distintos y cientos de compuestos han sido aislados y determinada su estructura, gracias al desarrollo de los nuevos métodos cromatográficos y espectroscópicos.

Los primeros sesquiterpenos fueron obtenidos, junto a los monoterpenos, de los aceites esenciales de las plantas. Pueden ser de naturaleza acíclica -farnesol-, hidrocarburos aromáticos -cadaleno, eudaleno-, que se obtienen de la dehidrogenación de los sesquiterpenoides cadineno y eudesmanol [79]; y de destacada relevancia, por su interés farmacológico, se cita al grupo de las lactonas sesquiterpénicas [122,390].

Derivan de la condensación de isopentenil pirofosfato, con 3,3-dimetil-alil-pirofosfato, dando geranil pirofosfato, que con otra unidad de isopentenil, origina el esqueleto C_{15} de 2E,6E-farnesil pirofosfato, correspondiente a los compuestos sesquiterpénicos ($C_{15}H_{24}$ = 3 unidades isoprenicas).

Los derivados sesquiterpenoides presentan interés biológico y farmacológico como 'antifeedants' -término que podría traducirse como inhibidores de la alimentación de larvas de insectos-, hormonas de insectos, fitoalexinas, antimicrobiales, reguladores del crecimiento vegetal, antiespasmódicos, antimaláricos y antineoplásicos [79,117]. La artemisina, aislada de *Artemisia annua*, es empleada en la medicina tradicional china,

para combatir la malaria, con actividad comparable a la cloroquina. Se ha demostrado marcada actividad antineoplásica frente a melanomas experimentales desarrollados en ratón, para derivados del bisabolano. Los sesquiterpenos de origen marino poseen un amplio espectro de actividades que van desde cardiotoxinas hasta antiespasmódicos. El gossypol estabiliza compuestos vinílicos por su capacidad antioxidante y han sido explotadas las propiedades organolépticas, por ejemplo del hernanducol, con poder edulcorante 1000 veces superior al de la sacarosa y de algunas lactonas sesquiterpénicas que poseen sabor amargo. La fragancia del sándalo y las violetas son debidas a sus compuestos terpénicos, profusamente empleados en la industria del perfume.

Diversas lactonas sesquiterpénicas han mostrado actividad antiinflamatoria [122,390; Apéndice II: Tesis 1], e incluso se han establecido algunos de los criterios de la relación estructura/actividad, que apuntan a que estas lactonas no poseen un mecanismo único de acción antiinflamatoria, ya que pueden interferir en diversos parámetros del proceso flogístico, y existen numerosos proyectos de investigación encaminados al esclarecimiento de su actividad sobre la cadena del ácido araquidónico y otros fenómenos que concurren en la inflamación.

ACEITES ESENCIALES EN EL GÉNERO *Teucrium*

Es el aceite esencial, como ocurre en la mayoría de las especies vegetales que han sido objeto de estudio farmacognóstico, uno de los componentes fitoquímicos del género *Teucrium* del que se tiene un mayor conocimiento. Probablemente, el auge que la espectrometría de masas y la cromatografía de gases experimentaron hace unos años, impulsó el análisis de los componentes volátiles de las esencias de numerosos especímenes.

Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de este género, son unas veces monoterpenos y otras sesquiterpenos, dependiendo de la especie botánica estudiada. Sólo en la especie *Teucrium marum* la biosíntesis de terpenoides parece estar dirigida a los monoterpenos ciclopentanoides, usualmente encontrados en el género *Nepeta* [351].

Dentro del grupo taxonómico que incluye al *Teucrium oxylepis*, es característico un elevado contenido en sesquiterpenos. Este taxon se desdobla en dos subespecies (*oxylepis* y *marianum*), en base a caracteres morfológicos, apoyado por los estudios realizados sobre la composición química de sus esencias [352].

La especie *Teucrium asiaticum* presenta linalol y acetato de linalilo como principales componentes monoterpénicos y α -calacoreno, calameneno y α -muuroleno, como sesquiterpenos, siendo casi inexistentes los alcoholes sesquiterpénicos [352].

Teucrium polium es una de las plantas aromáticas que más uso recibe en Arabia Saudí y se encuentra, ampliamente distribuido, a lo largo de toda la región. Se emplea, en medicina popular, como antiespasmódico, antirreumático, carminativo y en alimentación por su poder saborizante. En asociación con otras hierbas medicinales, se aplica para combatir la úlcera péptica. Una muestra fue recolectada en Sudair (Zona Central), a 180 Km. de Riyadh, mostrando su esencia, al menos, 10 compuestos terpenoides:

- * hidrocarburos: β -pineno, limoneno, α -felandreno, γ y δ -cadineno.
- * alcoholes: linalol, terpin-4-ol, cedrol, cedrenol y guaial.

Este estudio demuestra que se trata de un aceite esencial rico en alcoholes y exento de ésteres [132].

No sólo es conocido el *Teucrium polium* en las regiones saudíes, también es frecuente encontrarlo en zonas rocosas de los países mediterráneos, sin ir más lejos en Grecia, donde también recibe trato de hierba aromático-medicinal. Vokou y col. [370] encontraron datos dispares acerca de los componentes volátiles en los estudios, realizados con anterioridad, sobre esta especie, por lo que decidieron indagar con profundidad este aceite esencial. Para ello, se tomó una muestra del material biológico en terrenos calcáreos a 350m sobre el nivel del mar, cerca de Atenas, en el monte Hymettus. Se procedió al análisis, mediante técnicas de cromatografía gas-líquido/espectrometría de masas de la esencia, obtenida mediante aparato Clevenger y de la fracción volátil del extracto

éter-pentano, obtenido en soxhlet, revelando gran similitud con los estudios de Hassan *et al* [132], aunque no pudieron identificar α -felandreno, cedrol y guaiol.

En Italia es muy popular la especie *Teucrium chamaedrys*, como diurético y digestivo, comúnmente empleado en la preparación de licores, por sus características amargas y aromatizantes. El primer estudio que se llevó a cabo sobre su aceite esencial, data de 1957, en que se detectaron entre sus componentes al β -cariofileno, acetato de bornilo, pineno, canfeno, alcohol isoamílico, aldehído isovalérico y borneol. Posteriores estudios, permiten afirmar que se trata de una esencia rica en hidrocarburos sesquiterpénicos, con 31 compuestos en su composición, 28 de los cuales han podido ser reconocidos, confirmando en parte los trabajos existentes, aunque con algunas diferencias porcentuales [63].

Velasco-Negueruela [351] ofrece los siguientes porcentajes de los componentes mayoritarios de la esencia de *Teucrium gnaphalodes* L'Her.: α -pineno (14.2%), β -pineno (38.3%) y cariofileno (7.8%).

La esencia de la especie *Teucrium lusitanicum* ssp. *aureiformis*, planta aromática endémica de las serranías malagueñas, presenta en su composición 73 componentes, de los que el 98% han sido identificados. Del estudio cuali-cuantitativo puede deducirse que los compuestos más importantes son: α -pineno (4.20%), limoneno (15.09%), óxido de cariofileno (2.98%), espatulenol (2.90%), α -copaeno (4.50%), β -bourboneno (2.50%), terpinen-4-ol (3.48%), β -pineno (5.15%), linalol (2.31%), epóxido de humuleno (3.06%), t-cadinol (2.08%) y α -cadinol (3.33%) [351].

Valdés Bermejo & Sánchez-Crespo elevaron al rango de subespecie a *Teucrium lusitanicum* var. *aureiformis*, basándose exclusivamente en caracteres morfológicos; sin embargo, la composición química no parece apoyar esta propuesta, por lo que debería considerarse a este taxon como una variedad del *Teucrium lusitanicum* como indica Vicioso. La composición química de esta esencia sugiere que este taxon podría presentar actividad antiséptica, justificable por su riqueza en monoterpenos (53.21%) y antiinflamatoria, por los hidrocarburos sesquiterpénicos (21.83%), y en caso

de ser confirmada esta hipótesis, podría incluirse esta especie en la flora medicinal española.

Teucrium salviastrum, *Teucrium scorodonia* ssp. *scorodonia* y ssp. *baeticum* muestran un patrón similar en su composición en sesquiterpenos, confirmando la estrecha relación morfológica que existe entre estas especies [352].

MONOTERPENOS EN EL GÉNERO *Teucrium*

Se han descrito los iridoides harpágido y sus glicósidos 8-*O*-acetilharpágido y el bisglicósido teucardósido, en *T. polium* var. *pilosum* recolectada en el estado de Qatar (Golfo de Arabia), *T. polium* var. *alba*, procedente del desierto del Sinaí (Egipto) [255] y *T. arduini*, recogida en Croacia [152]. Entre las dos variedades no existe prácticamente ninguna diferencia, en cuanto al contenido en iridoides, aunque la concentración del 8-*O*-acetilharpágido fue algo mayor en la variedad *album*, de igual forma algunos iridoides, aún no identificados, sólo son detectados en esta variedad.

Los iridoides son monoterpenos de esqueleto bicíclico pentapiránico y suelen presentar un papel defensivo o repelente, en las especies en que aparecen. Generalmente, se presentan en forma heterosídica y se restringen a las *Asterideae*: *Gencianaceae*, *Lamiaceae*, *Scrophulariaceae*. Algunos de estos compuestos presentan una potencial utilidad como marcadores quimiotaxonómicos. No constituyen un grupo especialmente atractivo por sus propiedades farmacológicas, entre las que podrían citarse la antimicrobiana, laxante, diurética y citotóxica. Sin embargo, el harpágido constituye una molécula de especial interés farmacológico por su actividad antiinflamatoria y antiartrítica.

Algunos iridoides han demostrado poseer actividad antimicrobial en presencia de β -glucosidasas, por lo que Rizk y cols. sugirieron que el teucardósido podría ser uno de los principios activos, responsables de las propiedades atribuidas a esta planta, como cicatrizante de uso en heridas

superficiales. El teucardósido, fue ensayado frente a la leucemia P388, a la dosis de 200mg/Kg, no mostrando actividad citostática [255].

SESQUITERPENOS EN EL GÉNERO *Teucrium*

Pertenecientes al grupo de los guaianos, han sido aislados tres sesquiterpenos en las sumidades floridas de la especie *Teucrium leucocladum* Boiss., procedente de Sinaí (Egipto). Estos derivados sesquiterpénicos han sido nombrados como: teucradiol, teucatriol y 10-epiteucatriol [49] (Figura 3). La especie *Teucrium carolipau* posee el sesquiterpeno 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona (Figura 3), aislado junto a un compuesto neo-clerodano [290]. Hasta el momento, no se tenía conocimiento de la existencia de derivados eudesmanólidos en el género *Teucrium*, pero muy recientemente, han sido descritos tres eudesmanos en una especie endémica de la flora canaria, *Teucrium heterophyllum*, que reciben el nombre de teucdiol A, teucdiol B y teucronona (Figura 3) [100].

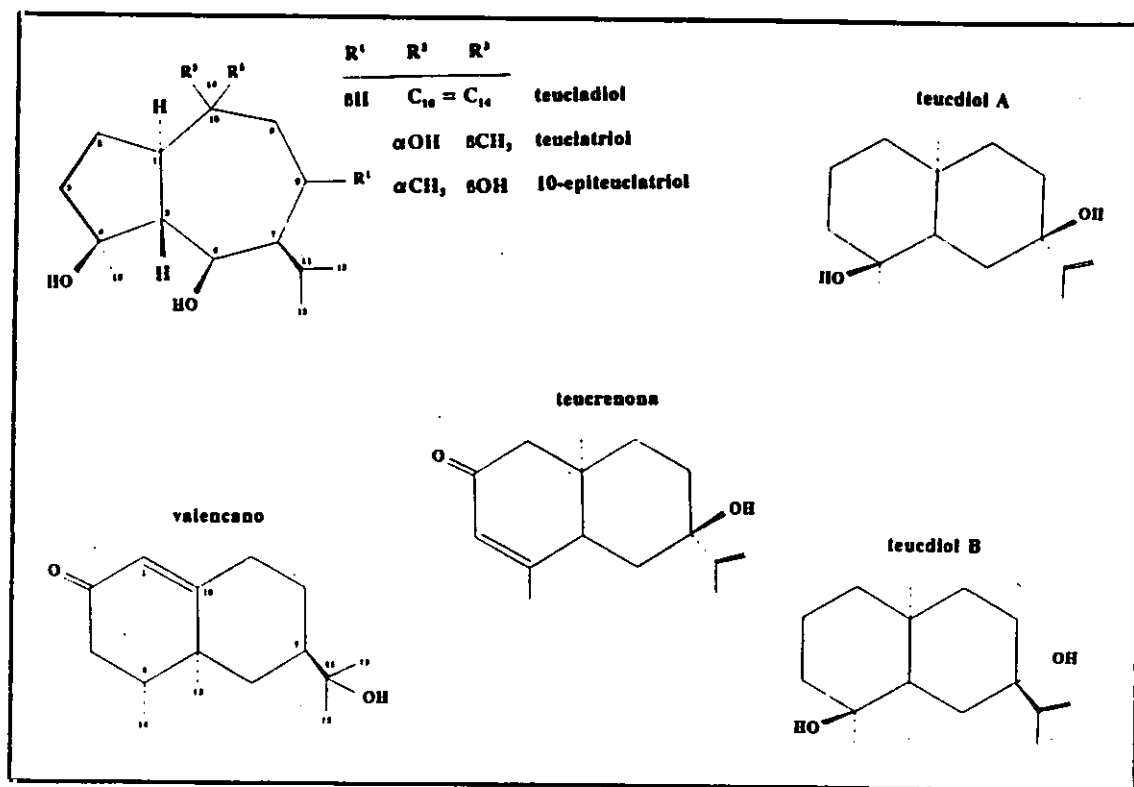


Figura 3. Sesquiterpenos aislados en el género *Teucrium*

DITERPENOS

Los diterpenos son compuestos derivados del 2E,6E,10E-geranilgeranil pirofosfato [79]. Por lo general, tienen una distribución limitada, excepto el fitol [127], detectándose en plantas, hongos, insectos y especies marinas. Poseen un esqueleto C_{20} , que proviene de la condensación de 4 unidades de isopreno. Están dotados de menor volatilidad que mono y sesquiterpenos, y al contrario que en el caso de triterpenos y esteroides, es frecuente la oxigenación de los radicales que llevan, existiendo grupos éter y lactonas con formación de interacciones 1:3 diaxiales. También se producen uniones puente, ciclados, generalmente en los diterpenos tetracíclicos, permitiendo la aparición de carbocationes y un gran número de reordenamientos del tipo Wagner-Meerwein. Existen dos series enantiómeras, serie 'normal', con el anillo A y B unido en la forma estereoquímica típica de esteroides, o serie 'ent'. Este prefijo, cuando sea preciso, acompaña al nombre del esqueleto principal.

Independientemente de las giberelinas, que gozan de una distribución universal, los diterpenos cíclicos aparecen de forma restringida, con respecto al resto de terpenoides. Los diterpenos son comunes en ciertos órdenes, como las Gentianales, particularmente prolíficas en Lamiales y Asterales, con una mayor distribución en Fabales y Geraniales.

Muchos de los diterpenos aislados hasta el momento pertenecen a las familias botánicas *Lamiaceae* y *Compositae* y la gran variedad estructural existente inclina a su uso como marcadores fitoquímicos. Sin embargo, se ha observado que la composición concreta varía con la estación del año, parte del vegetal y estado de madurez y subespecies.

Los diterpenos gozan de un amplio rango de actividades biológicas, entre las que se incluyen hormonas del crecimiento vegetal (giberelinas), inhibidores del crecimiento (podolactonas), principios amargos y 'antifeedants' (clerodanos), antitumorales (afidicolina), cocarcinogénicos (forbol), antibióticos (pleuromutilin), abortivos (zoapatanol) y antihipertensivos (foskolin).

Con poder antiinflamatorio se conocen diversos diterpenoides, algunos de ellos aislados por el grupo del Dr. Villar, de especies del género *Sideritis* (*Lamiaceae*): borjatriol [366,367], *ent*-16-hidroxi-13-epi-manoil óxido [4], 12 α -acetoxi-*ent*-13-epi-óxido de manoilo [368], *ent*-8 α -labda-13(16)14-dieno [Apéndice II: Tesis 5], andalusol [Apéndice II: Tesis 7]. Además, para algunos de ellos, se sugiere un mecanismo de acción no relacionado con la inhibición de la ciclooxigenasa, mecanismo habitual de la mayoría de los fármacos AINE.

También se atribuye acción antiinflamatoria, analgésica y antiviral a diversos diterpenos de origen marino, las pseudoterosinas, pseudopterólido y kallolidas, aislados de corales del género *Pseudoterogorgia* [91,180].

Los diterpenos pueden clasificarse estructuralmente en:

Acíclicos

Bicíclicos: Labdanos y Clerodanos

Tricíclicos: Pimaranos, Abietanos, Cassanos y Rosanos

Tetracíclicos: Giberelinas

Macrocíclicos y productos de ciclación

De esqueleto misceláneo

En el género *Teucrium* han sido aislados diterpenos bi y tricíclicos de las series del Clerodano y Abietano, así como la marrubina, lactona diterpénica que constituye el principio amargo de *T. chamaedrys*, *T. scorodonia* y *T. marum* [73], especies de este género que se conocen como tónicos digestivos y estimulantes, actividad posiblemente atribuible a dicha lactona diterpénica.

Dentro del grupo de los clerodanos no sólo existen dos series enantioméricas, sino que también se dan estructuras con relación *cis* y *trans*, entre el H8 y el sustituyente de C9. Además, se citan ejemplos de unión *cis/trans* entre el anillo A y B. Se estima que han sido aisladas cerca de 400 estructuras de esqueleto *ent* o *neo*-clerodano, muchas de ellas en especies del género *Teucrium*. En estos compuestos la presencia del 4,18-epóxido, el grupo acetoximetilo ($-\text{CH}_2\text{-OAc}$) y la función oxigenada en la posición 6, frecuentemente se encuentra asociada con actividad

'antifeedant', aunque aún no han sido fijados con certeza todos los requerimientos estructurales para dicha actividad.

Los abietanos podrían tener como progenitor al pimaradieno, de estructura tricíclica, por una migración simple de un grupo metilo. El ácido abiético es el representante más conocido de este grupo, siendo frecuentes las variaciones estructurales. El anillo C puede estar aromatizado, con formación de un fenol, como es el caso del ferruginol. Sin embargo, la mayor parte de los abietanos que han sido aislados, están en estado oxidado. Las podolactonas, procedentes de diversas especies de *Podocarpus*, son potentes inhibidores del crecimiento celular.

NEO-CLERODANOS EN EL GÉNERO *Teucrium*

El estudio fitoquímico de los compuestos diterpenoides de especies pertenecientes al género *Teucrium*, ha fascinado a diversos grupos de investigación, a juzgar por la abundante literatura encontrada sobre la química de estos compuestos. Estos estudios se han desarrollado sobre numerosas especies/subespecies de este género recolectadas en los más diversos países y continentes, ya que el mismo constituye una de las principales fuentes de diterpenos, fundamentalmente de la serie que muestra estereoquímica de configuración correspondiente al *ent*- o *neo*-clerodano, siendo posible encontrar también otros terpenos, del tipo abietano.

Este tipo de diterpenos derivados del *neo*-clerodano es típico de este género y familia, no se dan en otros géneros de la familia *Lamiaceae*, ni han sido descritos en otros géneros o familias botánicas, con dos únicas excepciones, teucvina y teucvidina, cuya presencia ha sido detectada en *Mallotus repandus* y *Croton caudatus*, respectivamente, ambas especies pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*; constituyendo, por tanto, los diterpenos *neo*-clerodanos, casi una exclusiva del género *Teucrium*. Hasta el momento, tan sólo se conoce una especie, *T. decipiens*, originaria de Marruecos, en la cual no ha sido detectado ningún derivado del *neo*-clerodano [23].

El interés por estos compuestos se ha visto estimulado, debido a la actividad biológica que presentan, como agentes 'antifeedants', antitumorales, antimicrobianos y antifúngicos. Por otro lado, no hay que olvidar el amplio uso popular que reciben, sobre todo las especies oriundas de las regiones bañadas por el mar Mediterráneo.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral es evidente el interés que despierta la química del género *Teucrium*, por lo que en esta memoria se expone una amplia revisión, que pretende actualizar el conocimiento que existe hasta la fecha, con respecto a la estructura y estereoquímica de estos productos. Muchos de estos compuestos ya fueron recogidos en anteriores revisiones [103,244,245] y en los últimos 5-6 años han sido aislados al menos 50 nuevos *neo*-clerodanos. Recientemente, ha sido publicada una amplia revisión sobre diterpenos de la serie del clerodano, que contempla también los derivados de este tipo que aparecen en el género *Teucrium* [203]. En la especie objeto de esta Memoria de Investigación, *Teucrium buxifolium*, han sido descritos dos derivados *neo*-clerodanos, 19-acetilgnafalina y 19-acetilteulepicina [245,289].

Las investigaciones realizadas en este campo, han permitido ampliar el conocimiento fitoquímico existente sobre el género, pero la importancia quimiotaxonómica es aún discutida, ya que diferentes muestras de la misma especie, pero recolectadas en distintos países, muestran diferencias en su contenido en *neo*-clerodanos. Por otro lado, es posible encontrar los mismos diterpenos en diferentes especies. Por ello, esta clase de productos naturales no parece constituir un adecuado grupo de marcadores quimiotaxonómicos, al menos de especies, aunque sigue siendo tema de controversia con respecto a las secciones del género, ya que sí parecen existir diferencias cualitativas en el grado de oxidación de los diterpenos, al menos entre las cinco distintas secciones a las que pertenecen las especies que pueblan el continente europeo (*Teucriis*, *Scordium*, *Scorodonia*, *Polium* y *Chamaedrys*).

Las técnicas analíticas empleadas han sido ^{13}C -RMN, ^1H -RMN, NOE, CD y CD-exciton chirality, análisis de difracción por Rayos X y el método Horeau, todas ellas de uso rutinario en la elucidación estructural y estereoquímica.

Características Generales

Las sustancias terpenoides, aisladas de sumidades floridas de especies pertenecientes al género *Teucrium*, presentan, sin excepción alguna hasta el momento, el esqueleto del clerodano o 19-norclerodano, con la configuración absoluta de *ent*-clerodanos, con anillo de furano β -sustituido. Se propone una vía biosintética, en la que esta estructura deriva de un reordenamiento del esqueleto del *ent*-labdano, de ahí que reciban el nombre de *ent* derivados. No obstante, ciertos grupos investigadores adoptaron la denominación *neo*-clerodano [44,244], por lo que es corriente el uso indistinto de ambas nomenclaturas.

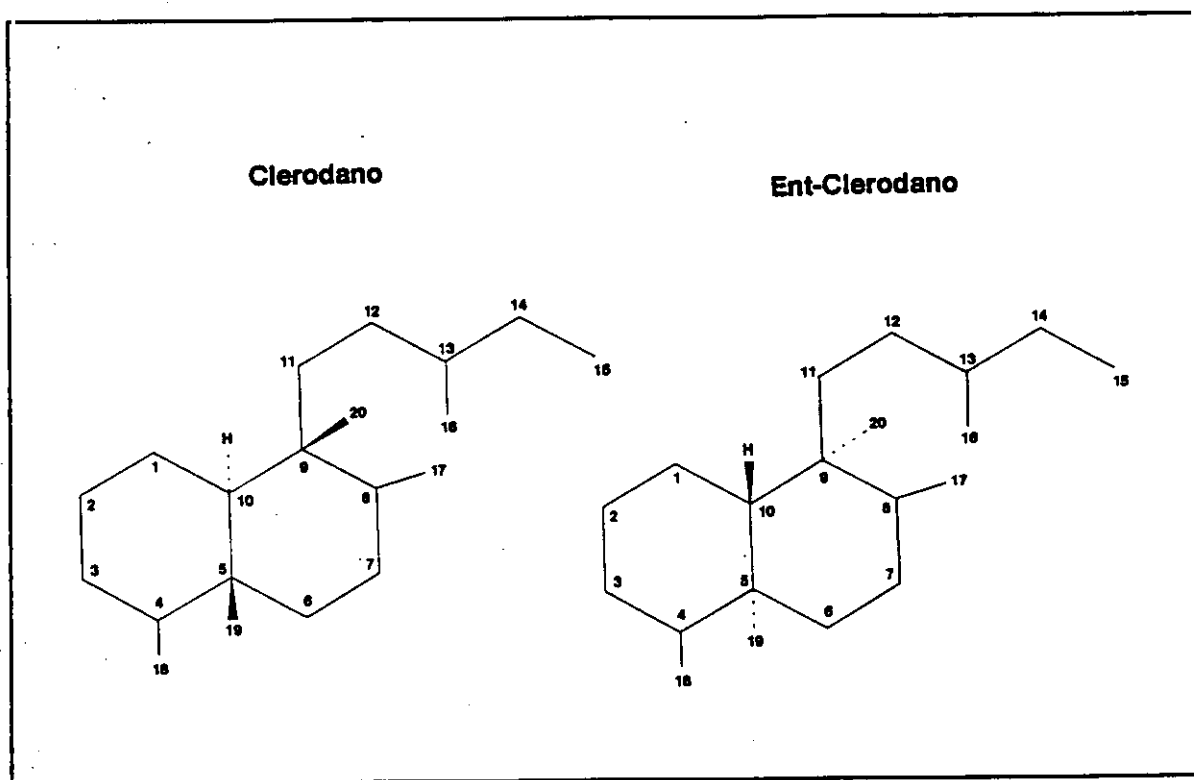


Figura 4. Esqueleto del clerodano y *ent*-clerodano

Comparten las siguientes características generales, salvo algunas excepciones, que se explicarán posteriormente:

- 1.- Todos los diterpenos aislados de *Teucrium* poseen, sin excepción alguna, el esqueleto *ent*-clerodano = *neo*-clerodano.
- 2.- Presentan un anillo de furano: C13, C14, C15 y C16, salvo escasas excepciones.
- 3.- La configuración absoluta del C12, por lo general se define S-. En esta posición poseen un grupo hidroxilo que acostumbra a formar una lactona o anillo lactónico con el C20.
- 4.- El carbono de la posición 20 se encuentra, prácticamente siempre oxidado.
- 5.- En C8 el grupo metilo suele estar en posición ecuatorial.
- 6.- Exhiben, por lo común, una función oxigenada en 6.

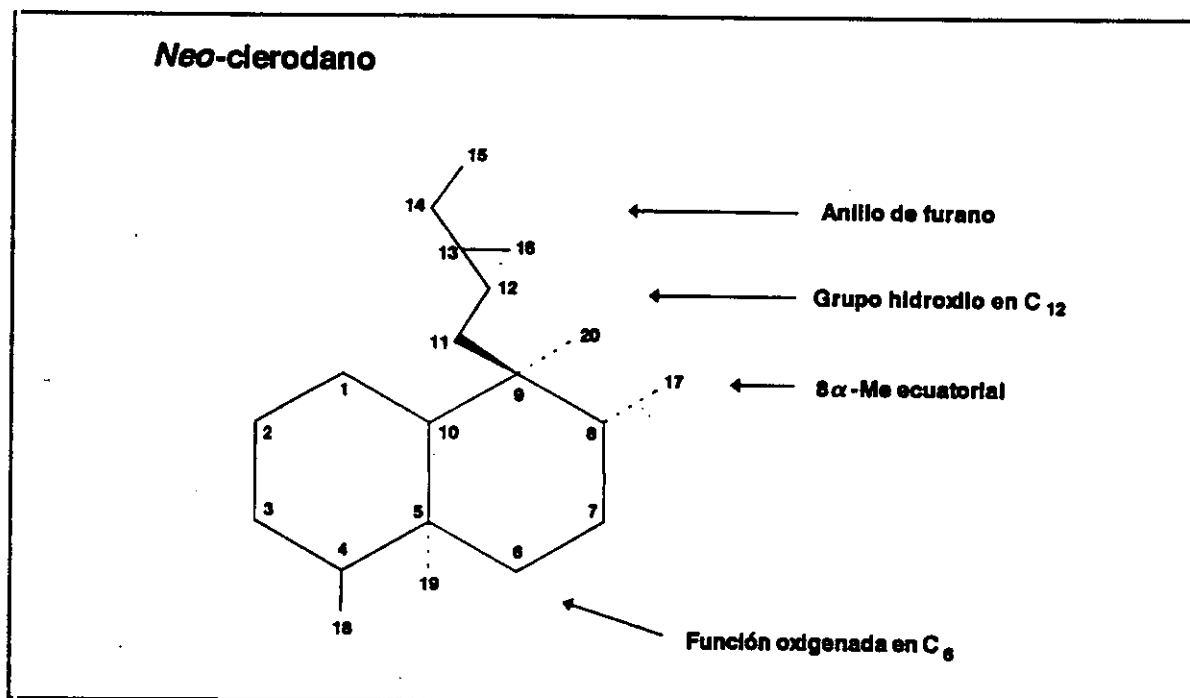


Figura 5. Características generales de los *neo*-clerodanos

Como ya se ha dicho, todos ellos poseen una estructura furano entre los carbonos 13 a 16, excepto deacetilajugarina II y teuponina [203], en los que el anillo se encuentra oxidado en forma de γ -lactona α,β -insaturada.

En C12, es común la presencia de un grupo hidroxilo, generalmente formando una lactona o anillo lactónico, con el C20. En algunas ocasiones, este grupo puede aparecer libre (teumassilina y su derivado diacetilado, teucroxilepina), acetilado (auropolina, teugracilina C y E, teucossina A y B, montanina H) o incluso no existir (teucrolivina B,C,D,E y F, fruticólido, deacetilajugarina II, fruticolona, 8β -hidroxifruticolona e isofruticolona).

Por lo general, la estereoquímica que este carbono asimétrico, C12, presenta es S, y tan sólo algunos poseen la configuración 12-R: 12-epiteucvina, montanina C, teupolina I, teusalvina C, teupyreinina y dentro de los *neo*-clerodanos recientemente descritos en el género, 12-epiteupolina II y (12R)-epiteuscordina. La determinación estereoquímica muchas veces no resulta todo lo sencilla que sería de desear, por lo que Lourenço *et al* proponen un nuevo método de análisis cristalográfico, por Rayos X, para así determinar la configuración absoluta de 12-hidroxi *neo*-clerodanos, a través de sus derivados clorados, empleando técnicas de ^1H -RMN, DC y DC-exciton chirality [182].

El C20 se encuentra siempre oxidado y como excepciones se citan: fruticolona, 8β -hidroxifruticolona e isofruticolona, de *T. fruticans*, y deacetilajugarina II, teumassilina y 6,19-diacetilteumassilina, aislados de *T. massiliense*; en todos ellos, el C20 existe como grupo metilo original.

Un grupo 8α -Me, de orientación ecuatorial se exhibe en casi todos los casos, con las excepciones de 7,8-dehidroeriocefalina, teuvincentina A y un derivado diosfenólico. En teupernina D, el grupo metilo está clorado, y formando parte de un carbono cuaternario, por la presencia adicional de un grupo hidroxilo en la posición 8.

En la posición 6 existe siempre una función oxigenada, siendo frecuente la aparición de un grupo ceto o hidroxilo, libre o acetilado, o formando una lactona o anillo lactónico, con C4.

Ciertos grupos funcionales y radicales pueden aparecer como rasgos distintivos, de clases o subclases, dentro de este conjunto de productos naturales: epóxido, γ -espirolactona, γ -lactona α,β -insaturada, lactona pentagonal, anillos de pirano... Por ejemplo, el carbono C4, se encuentra, frecuentemente, formando un anillo epóxido con el C18; en C7, puede existir una función acetoxi, o bien α o β -hidroxilo; y en la posición C19, sustituyentes hidroxilo o acetoxilo [96]; se han constatado cuatro clerodanos halogenados, tafricanina A y B [126] y teuvinentina A [57] con una función alquil primaria clorada en C18 y teupernina D en C8 [386]. Se ha elucidado sólo un derivado seco-*neo*-clerodano, el fruticólido [41] y dos glucósidos, el teuflavósido que es un 19-nor-*neo*-clerodano [286] y el teulamiósido [187].

El tratamiento térmico de estos compuestos proporciona productos de reordenación, con buen rendimiento, los cuales pueden ser intermediarios de la ruta biosintética de otros diterpenos *neo*-clerodanos, muchos de los cuales han sido descritos al menos ya como productos naturales [338].

Recientes Avances

Una gran variedad de especies de este género ha sido investigada en los últimos años, con el objetivo común del aislamiento de *neo*-clerodanos, y desde la última revisión bibliográfica, publicada en 1987 por Piozzi, se han descrito, más de 50 nuevos compuestos.

El análisis, por difracción de Rayos X, de los cristales de auropolina, ha permitido asignar la configuración S, para el C20 de este derivado *neo*-clerodano, aislado de *T. polium* subsp. *capitatum* y *T. asiaticum* [54].

2-deoxichamaedróxido fue aislado de la sumidad florida de *T. divaricatum* subsp. *canescens* [47], mientras que, de la especie *T. creticum*, ha sido aislado el primer C20 hidroxí-*neo*-clerodano del género, el teucretol. Todos los diterpenoides aislados de sumidades floridas de especies de este género, poseen el carbono de la posición 20 como grupo

metilo, aldehído, grupo acetal o hemiacetal, o formando parte de la función lactónica [285].

Del extracto acetónico de *T. micropodioides* se obtuvieron cinco nuevos neo-clerodano-derivados, teumicropina, 3-acetilteumicropina, teumicropodina, deacetilteupyrenona y 3-deacetil,20-epiteulanigina. Todos ellos poseedores de la estructura general atribuida a los diterpenos aislados de especies de *Teucrium* [342].

Teuvincentina A, B y C se han aislado de la sumidad florida de *T. polium* subsp. *vicentinum*, junto a otros diterpenos ya conocidos [57]. Teuvincentina A, tafricanina A y B y teupernina D son los únicos neo-clerodanos hidrociorados, y concretamente en el caso de *T. polium* subsp. *vicentinum* es interesante destacar el hecho de que esta especie crece en zonas costeras, terrenos en los que existe una elevada concentración de sales de cloro.

Desde el punto de vista biogénético, es importante resaltar que teuvincentina B y C son los primeros 17 β -neo-clerodanos aislados de especies del género *Teucrium*. Ambos poseen un grupo carbonilo en la posición 7, que en teuvincentina B se halla en forma hemiacetálica con C19; la configuración 8 β del grupo metilo C17, biogénicamente inusual, puede ser explicada considerando que la función carbonilo del carbono 7 provoca una epimerización en el carbono 8, para así permitir la formación del anillo hemiacetálico C7-C19.

Se han ampliado los estudios realizados sobre el extracto acetónico de *T. kotschyanum*, consiguiendo aislar tres nuevos diterpenoides, cuya estructura ha sido ya establecida: 12-epiteucvidina, 12-epiteuflina y teukotschina. Los primeros constituyen las formas C12(R) epiméricas de teucvidina y teuflina, respectivamente. La fórmula estructural de teukotschina corresponde con la de teuscorodina, con la única diferencia de la funcionalidad del C6.

T. kotschyanum es una de las pocas especies de este género que posee derivados del neo-clerodano con configuración C12(R) [300], así como *T. abutiloides* que posee montanina C y 12-epiteupolina II, ambos

pertenecientes a la serie de los C12 (R) *neo*-clerodanos, hecho éste que podría tener interés desde el punto de vista quimiotaxonómico. Por otro lado, de esta última especie han sido aislados dos nuevos *neo*-clerodanos, teubutilina A y B [343]. Otro compuesto de esta serie es (12R)-epiteuscordina, nuevo *neo*-clerodano aislado de *T. bicolor*, junto a otros ya conocidos [164].

Es importante el aislamiento de isoteuflina de *T. canadense*, especie también conocida como 'germandrina americana', ya que la estructura de este compuesto fue propuesta como uno de los pasos intermedios de la ruta biogenética de diterpenoides de la serie H-10 α -19-nor-*neo*-clerodanos, como el teucvidina y teuflidina. Hasta ahora no había sido demostrada su existencia como compuesto natural, de esta forma su importancia biogenética reside en que permite confirmar, al menos en parte, la ruta biosintética de estos compuestos. Junto a este compuesto se ha aislado también el 18-acetilmontanina D [46]. Por otro lado, isoteucrina H₄, aislado de *T. kotschyannum*, primer 19-nor-*neoclerodano* de origen natural, con un doble enlace C5-C10, apoya también dicha hipótesis biosintética. Esta unión olefínica, entre los carbonos 5 y 10, es muy poco frecuente en la naturaleza y sólo se conoce en algunos abeo-20(10 \rightarrow 9)-labd-5(10)-eno derivados [301].

T. pestalozzae constituye el material biológico del que se han obtenido, de forma natural, los diterpenos 4 α ,18-epoxitafricanina A y 20-oxoteuflavina, conocidos hasta ahora sólo como compuestos de origen sintético [335].

Teucrolivina A, B y C, aislados de *T. oliverianum* [43] y teupestalina A y B de *T. pestalozzae* [341], son los primeros *neo*-clerodanos C-10 oxigenados encontrados en este género, aunque ya han sido elucidadas más de 150 estructuras pertenecientes a este grupo de compuestos.

La configuración absoluta de algunos diterpenos montanina C, 12-epiteupolina II, teugnafalodina y teubutilina B, que no había sido determinada con total certeza, se ha puesto de manifiesto por correlación con algunos derivados obtenidos de 19-acetilgnafalina. Este estudio confirma su condición de *neo*-clerodanos [181]. Por otro lado y hasta el momento, todos

los diterpenoides aislados de sumidades floridas de especies del género *Teucrium*, y cuya estructura ha sido rigurosamente establecida, pertenecen a la serie del *neo-clerodano*.

Se han descrito los compuestos *teucrolivina* D-F, de la especie *T. oliveriaum*. *Teucrolivina* F es el primer tetranor-*neo-clerodano*, encontrado en este género, y por ahora, tan sólo el segundo diterpeno 13, 14, 15, 16-tetranor-*neo-clerodano* hallado en la naturaleza [334].

18 especies del género *Teucrium* florecen en el sur de China. Estudios sobre la especie *T. pernyi*, permitieron el aislamiento de tres diterpenos que aún no habían sido descritos, *teupernina* A, B y C [317,387], y un nuevo *neo-clerodano* halogenado, *teupernina* D [318,385,386]. La especie *T. bidentatum*, conocida desde antiguo en China y profusamente empleada en el tratamiento de la disentería y leucodermia, posee *bidentatina*, un nuevo compuesto de esta serie, considerado el primer 8 β -hidroxi-*neo-clerodano* con un grupo 18,19:20,12S-diolido, aislado de especies pertenecientes a este género [319].

T. gracile, especie que crece bajo la influencia del clima mediterráneo, contiene los nuevos diterpenoides *teugracilina* A, B, y C, y 3-O-deacetilteugracilina A, junto al ya conocido *teumicropodina*. La configuración absoluta de *teugracilina* C, así como la estereoquímica del C12 no ha sido establecida con certeza [42]. Posteriores estudios, dieron lugar al aislamiento de *teugracilina* D y E [41].

La especie *T. oxylepis* subsp. *marianum* posee *teucroxilepina* y 12-O-acetilteugnafalodina confirmando este último compuesto la existencia de derivados *neo-clerodan*-20,19-olidos de origen natural. No se trata, como cabría sospechar, de artefactos originados por translactonización de 20,12- γ -lactonas a 20,19- δ -lactonas, forma isomérica más estable. Esta afirmación parece evidente, en base a la estructura de este diterpeno natural, que posee una función acetoxi en la posición C12 [294].

(12S)-19-nor-*neo-cleroda*-15 α -hidroxi-4,13-diene-16,15;18,6 β ;20,12-triolido recibe el nombre de *teuponina*, el nuevo *neo-clerodano* aislado de *T. japonicum* [205].

Dos *neo-clerodanos*, *teucrolivina* G y H, con una estructura 2,6-dioxabicyclo [2.2.1] heptagonal, estructura bastante inusual, que puede considerarse como primicia en la naturaleza, han sido aislados de *T. oliverianum* [333]. Este ciclo, que implica las posiciones C8, C9, C10, C11 y C12 del esqueleto *neo-clerodano*, es poco frecuente en compuestos orgánicos y desde el punto de vista biogenético, debe destacarse que son los primeros *neo-clerodanos* simultáneamente oxidados en los carbonos 8 y 10, que han sido encontrados en el género *Teucrium*.

Un nuevo análisis sobre la especie *T. fruticans*, partiendo de una mayor cantidad de material vegetal, pone de manifiesto la presencia de un nuevo compuesto, aunque minoritario, *fruticólido*, junto con *fruticolona*, *isofruticolona* y 8β -hidroxifruticolona, diterpenos previamente aislados en esta planta. *Fruticólido* es el único 5,6-seco-*neo-clerodano* encontrado en el género [41].

La estereoquímica del centro asimétrico de la posición 12 y la configuración absoluta de *teucossina* A y B, procedentes de *T. cossoni* [7] y del diterpeno *montanina* H, aislado de *T. montanum* subsp. *montanum* [186], no ha podido ser asignada con garantía, aunque es probable que pertenezcan a la serie del *neo-clerodano*, en concordancia con el resto de los diterpenos aislados en el género.

A partir de *T. massiliense* se aísla el *neo-clerodano* *teumassina*, cuya estructura ha sido establecida por medidas espectroscópicas y transformación en un compuesto previamente descrito [43].

En la especie *T. leucocladum* Boiss. ha sido aislado el *clerodano* *montanina* C, junto a tres derivados sesquiterpénicos del grupo de los *guaianos* [49]. Así mismo, se ha descrito un nuevo glucósido, el *teulamiósido*, de la especie *T. lamiifolium* [187].

En los siguientes esquemas se refleja el contenido en *neo-clerodanos* de las especies del género *Teucrium*, ordenadas según la sección a la que pertenecen, referencia bibliográfica entre corchetes, lugar de recolección y junto al nombre del derivado *neo-clerodano*, entre paréntesis, el número de fórmula correspondiente.

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
SECCIÓN TEUCRIS Benth		
<i>T. fruticans</i> [41, 244, 245, 280, 281]	Sicilia Italia	fruticolona(16) isofruticolona(18) 8 β -hidroxifruticolona(17) fruticólido(15)
<i>T. creticum</i> = <i>T. rosmarinifolium</i> [285]	Lyrodonda Chipre	teucretol(47) 6,19-diacetilteumassilina(103) 19-acetilgnafalina(21) teucjaponina B(43)
SECCIÓN STACHYBOTRYE		
<i>T. lamiifolium</i> [187, 33, 183]	Malko Tirново Bulgaria	12-epiteupolina II(117) teuscordinon(142) teuflina(78) montanina C(26) 19-acetilgnafalina(21) teulamifina B=teubotrina(39) 19-deacetilteuscorodol(146) teucróxido(66) teulamiósido(91)
SECCIÓN SCORODONIA (Hill) Schr.		
<i>T. scorodonia</i> [193, 194, 245]	León España	teupolina I(114) teuscorólido(149) teuscorodal(144) teuscorodol(145) 2 α -hidroxiteuscorólido(150) teuscorodina(147) teuscorodonina(148)
<i>spp scorodonia</i> [44, 89, 105, 245]	Colinas de Brianza Italia [44, 245] Norte de España [41, 42, 44, 89, 245]	teuflina(78) teuscorólido(149) teuscorodina(147) teuscorodina(147) teuscorólido(149) teupolina I(114) teuscorodal(144) teuscorodol(145) teuscorodonina(148) 2 α -hidroxiteuscorólido(150)

ESTUDIO FITOQUIMICO

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
<i>ssp euganeum</i> [44,105,244,245]	Sicilia Italia	teuflina(78)
	Norte de España	teuscorólido(149) teuscorodina(147) teupolina I(114) teuscorodal(144) teuscorodol(145) 2 α -hidroxiteuscorólido(150)
<i>T. massiliense</i> [45,89,245,278]	Cerdeña Italia	6,19-diacetilteumassilina(103) montanin C(26) teucjaponina A(42) 19-acetilgnafalina(21) teumassilina(102) deacetilajugarina II(8) teumarina(101) teumassina(104)
<i>T. salviastrum</i> [245,339]	Sierra de la Estrella Portugal	teusalvina A(131) teusalvina B(132) teusalvina C(133) teusalvina D(134) teusalvina E(135) teusalvina F(136) teucvidina(68) teucróxido(66)
<i>T. asiaticum</i> [54]	Mallorca España	auropolina(1) teuflina(78)
SECCION <i>SCORDIUM</i> (Miller) Bentham		teuscordinon(142) 6 α -hidroxiteuscordina(137) 6-ketoteuscordina(139) 6 β -hidroxiteuscordina(138) 2 β ,6adihidroxiteuscordina=
<i>T. scordium</i> <i>ssp scordium</i> [104,230,231,232,233,245]	Sadovo Bulgaria	=teugina(80) teucrina E(50) teucrina H ₄ (55) montanina E(29) 2-ceto-19-OH-teuscordina(140)

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
<i>cont. T. scordium</i> <i>ssp scordium</i> [104, 230, 231, 232, 233, 245]	Alemania [245]	teucrina E(50) teugina(80) 6 α -hidroxiteuscordina(137) 6 β -hidroxiteuscordina(138) teuscordinon(142) dihidroteugina(81)=teucrina B teucróxido(66) 6-acetilteucjaponina B(44) 2,3-dehidroteucrina E(51) 2 β ,6dihidroteuscordina=teugina(80) 2 β -hidroxiteuscordinon(143) 6,20-bisdeacetil- teupyreinidina(125) 6-deacetilteupyreinidina(124)
<i>T. spinosum</i> [244, 245, 283]		teuspinina(151) 19-acetilteuspinina(152) 19-acetilgnafalina(21)
<i>T. botrys</i> [245, 337]	Teruel España Castellón España	6 β -hidroxiteuscordina(138) teucvidina(68) montanina D(27) teuchamaedrina C(73) 19-deacetilteuscorodol(146) teubotrina(39)=teulamifina B
SECCIÓN CHAMAEDRYS (Miller) Schr.		
<i>T. chamaedrys</i> [87, 94, 103, 104, 185, 229, 244, 245, 259, 260, 279]	Moldavia Rusia [103, 245] Pazarrdjik Bulgaria var. <i>chamaedrys</i> [104, 185, 229, 244, 245]	teucrin A(48) teucrina B=dihidroteugina(81) teucrina E(50) teucrina F(52) teucrina G(53) teucrina A(48) teucrina E(50) teuchamaedrina A=teuflina(78) teuchamaedrina B= =teucrina H ₂ (54) teuchamaedrina C(73) 6 α -hidroxiteuscordina(137) dihidroteugina(81)=teucrina B

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
<i>cont. T. chamaedrys</i> [87,94,103,104,185,229, 244,245,259,260,279]	Guadalajara España [87,94,245, 259,279,260]	dihidroteugina(81)=teucrina B teucrina A(48) teugina(80) chamaedróxido(6) 6-epiteucrina A(49) teuflina(78) teuflidina(76) teucrina E(50) teuchamaedrina B=teucrina H ₂ (54) isoteuflidina(77) teucróxido(66)
	Lombardia Italia [245,260]	teucvina(71) teucvidina(68) teuflina(78) teucrina A(48) teucrina F(52) teucrina G(53)
<i>T. webbiana</i> [245,287]	Castellón España	2β-hidroxitauclidina(69) teuflidina(76) teucrina A(48)
<i>T. lucidum</i> [44,245]	Alpes Marítimos Italia	teucvidina(68) teuflina(78) teucrina F(52) teucrina G(53) 6α-hidroxitauclidina(137)
<i>T. divaricatum</i> <i>ssp. canescens</i> [47]	Larnaca Chipre	2-deoxichamaedróxido(7)
<i>T. flavum ssp. flavum</i> [244,245,282,284]	Sicilia Italia	teuflidina(76) teuflina(78)
<i>ssp. glaucum</i> [89,245,286]	Cerdeña Italia	teuflavina(74) teuflavósido (19-nor-neo- clerodanoglucósido)(25) 12-epiteucvina(72) teuflina(78)
<i>T. intricatum</i> [44,244,245]	España Central	teucvina(71)
<i>T. fragile</i> [48,244,245]	Granada España	teugina(80)
<i>T. microphyllum</i> [335]	Creta Grecia	teucrina A(48) teucrina G(53) teugina(80) dihidroteugina(81)
<i>T. marum</i> [245,288]	Cerdeña Italia	teumarina(101)

ESTUDIO FITOQUÍMICO

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
<i>T. subspinosum</i> [93,245]	Mallorca España	teucvina(71) teuflina(78) teucrina H ₂ (54)=teuchamaedrina B 6α-hidroxitheuscordina(137)
SECCIÓN POLIUM (Miller) Schr.		
<i>T. pyrenaicum</i> [93,108,245]	León España	teupyrenona(127) teupyreinina(126) teupyreinidina(123) teupyrina A(129) teupyrina B(130)
<i>T. buxifolium</i> [245,289]	Alicante España	19-acetilgnafalina(21) 19-acetilteulepicina(100)
<i>T. gracile</i> [41,42]	Karpatos Grecia	teugracilina A(84) teumicropodina(106) teugracilina C(87) 3-O-deacetilteugracilina A(85) teugracilina B(86) teugracilina D(88) teugracilina E(89)
<i>T. montanum</i> <i>ssp skorpilii</i> [104,189,228,244,245]	Rhodopes Bulgaria	montanina A(23) montanina B(24) montanina C(26) montanina D(27) montanina E(29) montanina F=teucjaponina A(42)
<i>T. montanum</i> <i>ssp montanum</i> [7,186]	Bansko Bulgaria	19-acetilgnafalina(21) montanina D(27) montanina B(24) teubotrina(39)=teulamifina B montanina E(29) montanina H(30)
<i>T. cossonii</i> [7]	Mallorca España	teucossina A(45) teucossina B(46) montanina H(30)
<i>T. carthaginense</i> <i>ssp homotrichum</i> [44,244,245] = <i>T. homotrichum</i>	Sur de España	19-acetilgnafalina(21) eriocefalina(10)
<i>T. carolipau</i> [290]	Alicante España	19-acetilgnafalina(21)
<i>ssp carolipau</i> [245]	Sur de España	picropolinona(35) 19-acetilgnafalina(21)

ESTUDIO FITOQUÍMICO

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
<i>T. turredanum</i> [336]	Almería España	19-acetilgnafalina(21) eriocefalina(10) isoeriocefalina(13)
<i>T. polium</i> [103,104,244,245]	Alemania [103,244,245]	picropolina(31) 6-acetilpicropolina(32) isopicropolina(33)
	Moldavia [244]	teucrina P ₁ (57)
	Bulgaria [104,188,244]	19-acetilgnafalina(21) montanina B(24) teucrina P ₁ (57) teupolina I(114) teupolina II(116)
<i>T. polium</i> [245]		montanina E(29)
<i>ssp aureum</i>	Sicilia Italia [86,244]	gnafalidina(19) teucrina P ₁ (57)
	Sur de España [86,244,245]	19-acetilgnafalina(21) auropolina(1)
<i>ssp polium</i> [184,188,190,245,183]	Plovdiv Bulgaria	19-acetilgnafalina(21) teucrina P ₁ (57) teupolina I(114) teupolina II(116) teupolina III(118) teupolina IV(119) teupolina V(121) teubotrina(39)=teulamifina B 19-deacetylteuscorodol(146) teucróxido(66)
<i>ssp capitatum</i> [54,96,198,244,245]	Madrid España [96,198,244, 245]	picropolina(31) 19-acetilgnafalina(21) derivado de diosfenol(9) 7-deacetylcapitata(4) picropolinol(34) 20-epi-isoeriocefalina(14) picropolinona(35) teucjaponina B(43)
	Centro/Suroeste de España [197,199,245]	picropolina(31) picropolinona(35) 19-acetilgnafalina(21) capitata(3) teucapitata(5) lolina(22)

ESTUDIO FITOQUIMICO

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
<i>cont. ssp capitatum</i> [54,96,198,244,245]	Mallorca España [54]	19-acetilgnafalina(21) auropolina(1)
<i>ssp belion</i> [54]	Mallorca España	19-acetilgnafalina(21) teucrina A(48)
<i>ssp vincentinum</i> [57]	Cabo San Vicente Portugal	teuvincentina A(153) teuvincentina B(154) teuvincentina C(155) 19-acetilgnafalina(21) eriocefalina(10) isoeriocefalina(13) 3-deacetil-20-epiteulanigina(97)
<i>ssp expansum</i> [7]	Guadalajara España	picropolinona(35) 19-acetilteulepicina(100) 3-O-deacetilteugracilina A(85)
<i>ssp pilosum</i> [245,340] = <i>T. pilosum</i> = <i>T. sinaicum</i>	Qatar Golfo de Arabia	19-acetilteupolina IV(120)
<i>T. gnaphalodes</i> [200,244,245,344]	Madrid España	gnafalina(20) 19-acetilgnafalina(21) gnafalidina(19) teucrina P ₁ (57) teugnafalodina(82)
<i>T. lepicephalum</i> [245,289]	Alicante España	19-acetilteulepicina(100) teulepicefina(98) teulepicina(99)
<i>T. eriocephalum</i> [90,244]	Almería España	eriocefalina(10)
<i>T. lanigerum</i> = <i>T. eriocephalum ssp rubrifolium</i> [89,95,105,142,245]	Murcia España	eriocefalina(10) teupolina I(114) 20-deacetileroiocefalina(12) isoeriocefalina(13) 7,8-dehidroeriocefalina(11) teulanigeral (no natural)(92) teulanigina (no natural)(95) 20-epiteulanigina (no natural)(96) teulanigerina (no natural)(94) teulanigeridina (no natural)(93)
OTRAS SECCIONES <i>T. barbeyanum</i> [44,245]	Cyrenaica Libia	teucrina A(48) teucrina F(52) teucrina G(53)

ESTUDIO FITOQUÍMICO

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
<i>T. canadense</i> [46,105]	Ontario Canadá	teucvidina(68) teuflina(78) teucvina(71) 12-epiteupolina II(117) teuscorodal(144) teupolina I(114) 18-acetilmontanina D(28) isoteuflidina(77)
<i>T. oliverianum</i> [43,333,334]	Gassim Arabia Saudi	teucrolivina A(58) teucrolivina B(59) teucrolivina C(60) teucrolivina D(61) teucrolivina E(62) teucrolivina F(63) teucrolivina G(64) teucrolivina H(65)
<i>T. bellon</i> [45]	Montpellier Francia	19-acetilgnafalina(21) eriocefalina(10)
<i>T. viscidum</i> [62]		teucvina(71)
<i>T. viscidum</i> var. <i>miquelianum</i> [103,154,244,245]		teucvina(71) teucvidina(68) teuflina(78)
<i>T. cubense</i> [103,244,245]	México	teucvina(71)
<i>T. hyrcanicum</i> [106,245]	Armenia Hungria	teucrina H ₁ =teuflidina(76) teucrina H ₂ (54) teucrina H ₃ =19-acetilgnafalina(21) teucrina H ₄ (55)
<i>T. japonicum</i> [205,206,208,245]	Jiangxi China	teucvina(71) teucjaponina A(42) teucjaponina B(43) teuponina(122)
<i>T. africanum</i> [126,245]	Sudáfrica	tafricanina A(36) tafricanina B(38)
<i>T. montbretii</i> ssp <i>heliotropiifolium</i> [7]	Karpatos Grecia	teucrina H ₂ (54) 6β-hidroxitheuscordina(138) montanina D(27) teugina(80)

ESTUDIO FITOQUIMICO

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
<i>T. montbretii</i> <i>ssp montbretii</i> [45]	Antakya Turquia	2-deoxichamaedróxido(7) teuflina(78) 6-cetoteuscordina(139) montanina C(26) 6-acetilteucjaponina B(44) teucrina H ₂ (54) 6β-hidroxitescordina(138) 2β-hidroxitescordinon(143) montanina D(27) teugina(80)
<i>T. micropioides</i> [342]	Cabo Griego Chipre	3-acetilteumicropina(106) teumicropina(105) deacetilteupyrenona(128) teumicropodina(107) 3-deacetil-20-epi-teulanigina(97)
<i>T. kotschyanum</i> [300,301] = <i>t. smyrnaeum</i>	Valle Cedar Chipre	12-epiteucvidina(70) 12-epiteuflina(79) teukotschina(90) teucvidina(68) teuflina(78) teuscorodina(147) teucrina H ₂ (54) teuscorodonina(148) montanina D(27) isoteucrina H ₄ (56)
<i>T. bicolor</i> [164]	Cuesta Zapata IV Región Chile	12-epiteuscordonina(141) montanina C(26) teucvina(71) 12-epiteucvina(72) teupolina I(114) 12-epiteupolina I(115) teucrina H ₂ (54)
<i>T. heterophyllum</i> [245,100]	Islas Canarias España	teucvidina(68)
<i>T. abutiloides</i> = <i>T. umbrosum</i> [181,343]	Isla de Madeira Portugal	montanina C(26) 12-epiteupolina II(117) teubutilina A(40) teubutilina B(41)
<i>T. pestalozzae</i> [335,341]	Burdur Turquia	tafricanina A(36) 4α,18-epoxitafricanina A(37) 20-oxoteuflavina(75) teupestalina A(112) teupestalina B(113)
<i>T. odontites</i> [335]	Antalya Turquia	teucrina H ₂ (53) montanina D(27) teuscorodol(145)

ESTUDIO FITOQUÍMICO

ESPECIES	PROCEDENCIA	NEO-CLERODANOS
<i>T. bidentatum</i> [319]	Guizhou China	6-cetoteuscordina(139) teuscordinon(142) teucrina H ₂ (54) teuflina(78) bidentatina(2)
<i>T. pernyi</i> [317,318,385,386,387]	Jiangxi China [386,387]	teupernina A(108) teupernina B(109) teupernina C(110) teupernina D(111) teucvidina(68) teuflina(78)
	Anhui China [318]	teucvidina(68) teuflina(78) montanina D(27) teuscorodina(147) teupernina D(111)
<i>T. queadrifarium</i> [298]	China	teucvidin(68) teuflina(78)
<i>T. leucocladum</i> [49]	Sinai Egipto	montanina C(26)
<i>T. oxylepis</i> ssp <i>marianum</i> [294]	Jaén España	teucroxilepina(67) 12-O-acetilteugnafalodina(83) gnafalina(20) 19-acetilgnafalina(21) teuscorodonina(148) montanina D(27) teucrina H ₄ (55) 19-deacetilteuscorodol(146) teubotrina(39)=teulamifina B teucróxido(66) teukotschina(90) isoteucrina H ₄ (56)

En total, se han descrito 155 compuestos derivados del neo-clerodano en este género:

1. auropolina	<i>T.asiaticum</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>aureum</i> y ssp <i>capitatum</i>
2. bidentatina	<i>T.bidentatum</i>
3. capitatina	<i>T.polium</i> ssp <i>capitatum</i>
4. 7-deacetilcapitatina	<i>T.polium</i> ssp <i>capitatum</i>
5. teucapitatina	<i>T.polium</i> ssp <i>capitatum</i>
6. chamaedróxido	<i>T.chamaedrys</i>
7. 2deoxichamaedróxido	<i>T.divaricatum</i> ssp. <i>canescens</i> , <i>T.montbretii</i> ssp <i>montbretii</i>
8. deacetilajugarina II	<i>T.massiliense</i>
9. derivado diosfenol	<i>T.polium</i> ssp <i>capitatum</i>
10. eriocefalina	<i>T.carthaginense</i> , <i>T.turredanum</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>vicentinum</i> , <i>T.eriocephalum</i> , <i>T.belion</i> , <i>T.lanigerum</i>
11. 7,8dehidroeriocefalina	<i>T.lanigerum</i>
12. 20deacetileriocefalina	<i>T.lanigerum</i>
13. isoeriocefalina	<i>T.eriocephalum</i> , <i>T.lanigerum</i> , <i>T.turredanum</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>vicentinum</i>
14. 20epiisoseriocefalina	<i>T.polium</i> ssp <i>capitatum</i>
15. fruticólido	<i>T.fruticans</i>
16. fruticolona	<i>T.fruticans</i>
17. 8βhidroxifruticolona	<i>T.fruticans</i>
18. isofruticolona	<i>T.fruticans</i>
19. gnafalidina	<i>T.polium</i> ssp <i>aureum</i> , <i>T.gnaphalodes</i>
20. gnafalina	<i>T.gnaphalodes</i> , <i>T.oxylepis</i> ssp <i>marianum</i>
21. 19acetilgnafalina	<i>T.gnaphalodes</i> , <i>T.creticum</i> , <i>T.massiliense</i> , <i>T.buxifolium</i> , <i>T.turredanum</i> , <i>T.belion</i> , <i>T.hyrceanicum</i> , <i>T.polium</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>polium</i> , <i>aureum</i> , <i>capitatum</i> , <i>belion</i> , <i>vincentinum</i> , <i>T.oxylepis</i> ssp <i>marianum</i> , <i>T.carolipau</i> , <i>T.carolipau</i> ssp <i>carolipau</i> , <i>T.montanum</i> ssp <i>montanum</i> , <i>T.carthaginense</i> ssp <i>homotrichum</i> , <i>T.lamiifolium</i>
22. lolina	<i>T.polium</i> ssp <i>capitatum</i>
23. montanina A	<i>T.montanum</i> ssp <i>skorpilii</i>
24. montanina B	<i>T.montanum</i> ssp <i>skorpilii</i> , ssp <i>montanum</i> , <i>T.polium</i>
25. teuflavósido	<i>T.flavum</i> ssp <i>glaucum</i>
26. montanina C	<i>T.massiliense</i> , <i>T.bicolor</i> , <i>T.abutiloides</i> , <i>T.montanum</i> ssp <i>skorpilii</i> , <i>T.montbretii</i> ssp <i>montbretii</i>
27. montanina D	<i>T.botrys</i> , <i>T.odontites</i> , <i>T.kotschyannum</i> , <i>T.montanum</i> ssp <i>montanum</i> , <i>skorpilii</i> , <i>T.montbretii</i> ssp <i>montbretii</i> , <i>heliotropifolium</i> , <i>T.oxylepis</i> ssp <i>marianum</i>
28. 18acetilmontanina D	<i>T.canadense</i>
29. montanina E	<i>T.polium</i> , <i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i> , <i>T.montanum</i> ssp <i>montanum</i> , <i>skorpilii</i>
30. montanina H	<i>T.cossoni</i> , <i>T.montanum</i> ssp <i>montanum</i>
31. picropolina	<i>T.polium</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>capitatum</i>
32. 6acetilpicropolina	<i>T.polium</i>
33. isopicropolina	<i>T.polium</i>
34. picropolinol	<i>T.polium</i> ssp <i>capitatum</i>
35. picropolinona	<i>T.carolipau</i> ssp <i>carolipau</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>expansum</i> , <i>capitatum</i>
36. tafricanina A	<i>T.africanum</i> , <i>T.pestalozzae</i>
37. 4α,18epoxitafricanina A	<i>T.africanum</i>
38. tafricanina B	<i>T.africanum</i>
39. teubotrina	<i>T.botrys</i> , <i>T.oxylepis</i> ssp <i>marianum</i> , <i>T.montbretii</i> ssp <i>montanum</i> , <i>T.lamiifolium</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>polium</i>
40. teubutilina A	<i>T.abutiloides</i>
41. teubutilina B	<i>T.abutiloides</i>
42. teucjaponina A	<i>T.japonicum</i> , <i>T.massiliense</i> , <i>T.montanum</i> ssp <i>skorpilii</i>
43. teucjaponina B	<i>T.japonicum</i> , <i>T.massiliense</i> , <i>T.montanum</i> ssp <i>skorpilii</i>
44. 6acetilteucjaponina B	<i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i> , <i>T.montbretii</i> ssp <i>montbretii</i>
45. teucossina A	<i>T.cossoni</i>
46. teucossina B	<i>T.cossoni</i>
47. teucretol	<i>T.creticum</i>
48. teucrina A	<i>T.barbeyannum</i> , <i>T.webbianum</i> , <i>T.chamaedrys</i> , <i>T.microphyllum</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>belion</i>

ESTUDIO FITOQUIMICO

49. 6epiteucrina A	<i>T. polium</i> ssp <i>capitatum</i>
50. teucrina B	<i>T. lucidum</i> , <i>T. chamaedrys</i> , <i>T. barbeyanum</i> , <i>T. microphyllum</i>
51. 2,3dehidroteucrina E	<i>T. chamaedrys</i> , <i>T. chamaedrys</i> ssp <i>chamaedrys</i> , <i>T. scordium</i> ssp <i>scordium</i>
52. teucrina F	<i>T. scordium</i> ssp <i>scordium</i>
53. teucrina G	<i>T. barbeyanum</i> , <i>T. lucidum</i> , <i>T. chamaedrys</i>
54. teucrina H2	<i>T. subspinosum</i> , <i>T. kotschyanum</i> , <i>T. hyrcanicum</i> , <i>T. odontites</i> , <i>T. bidentatum</i> , <i>T. bicolor</i> , <i>T. chamaedrys</i> , <i>T. chamaedrys</i> ssp <i>chamaedrys</i> , <i>T. montbretii</i> ssp <i>montbretii</i> , <i>heliotropifolium</i>
55. teucrina H4	<i>T. hyrcanicum</i> , <i>T. scordium</i> ssp <i>scordium</i> , <i>T. oxylepis</i> ssp <i>marianum</i>
56. isoteucrina H4	<i>T. kotschyanum</i> , <i>T. oxylepis</i> ssp <i>marianum</i>
57. teucrina Pl	<i>T. gnaphalodes</i> , <i>T. polium</i> , <i>T. polium</i> ssp <i>polium</i> , <i>aureum</i>
58. teucrolivina A	<i>T. oliverianum</i>
59. teucrolivina B	<i>T. oliverianum</i>
60. teucrolivina C	<i>T. oliverianum</i>
61. teucrolivina D	<i>T. oliverianum</i>
62. teucrolivina E	<i>T. oliverianum</i>
63. teucrolivina F	<i>T. oliverianum</i>
64. teucrolivina G	<i>T. oliverianum</i>
65. teucrolivina H	<i>T. oliverianum</i>
66. teucróxido	<i>T. salviastrum</i> , <i>T. polium</i> ssp <i>polium</i>
67. teucroxilepina	<i>T. oxylepis</i> ssp <i>marianum</i>
68. teucvidina	<i>T. salviastrum</i> , <i>T. pernyi</i> , <i>T. canadense</i> , <i>T. botrys</i> , <i>T. queadrifarium</i> , <i>T. heterophyllum</i> , <i>T. kotschyanum</i> , <i>T. lucidum</i> , <i>T. chamaedrys</i> , <i>T. viscidum</i> ssp <i>miquelianum</i>
69. 2βhidroxiteucvidina	<i>T. webbiana</i>
70. 12epiteucvidina	<i>T. kotschyanum</i>
71. teucvina	<i>T. bicolor</i> , <i>T. japonicum</i> , <i>T. cubense</i> , <i>T. canadense</i> , <i>T. subspinosum</i> , <i>T. intricatum</i> , <i>T. chamaedrys</i> , <i>T. viscidum</i> , <i>T. viscidum</i> ssp <i>miquelianum</i>
72. 12epiteucvina	<i>T. flavum</i> ssp <i>glaucum</i> , <i>T. bicolor</i>
73. teuchamaedrina C	<i>T. botrys</i> , <i>T. chamaedrys</i> var. <i>chamaedrys</i>
74. teuflavina	<i>T. flavum</i> ssp <i>glaucum</i>
75. 20oxoteuflavina	<i>T. pestalozzae</i>
76. teuflidina	<i>T. hyrcanicum</i> , <i>T. webbiana</i> , <i>T. chamaedrys</i> , <i>T. flavum</i> ssp <i>flavum</i>
77. isoteuflidina	<i>T. canadense</i> , <i>T. chamaedrys</i>
78. teuflina	<i>T. subspinosum</i> , <i>T. lucidum</i> , <i>T. asiaticum</i> , <i>T. kotschyanum</i> , <i>T. canadense</i> , <i>T. bidentatum</i> , <i>T. pernyi</i> , <i>T. queadrifarium</i> , <i>T. chamaedrys</i> , <i>T. chamaedrys</i> var. <i>chamaedrys</i> , <i>T. montbretii</i> ssp <i>montbretii</i> , <i>T. scorodonia</i> ssp <i>scorodonia</i> , <i>euganeum</i> , <i>T. lamiifolium</i>
79. 12epiteuflina	<i>T. kotschyanum</i>
80. teugina	<i>T. fragile</i> , <i>T. microphyllum</i> , <i>T. chamaedrys</i> , <i>T. scordium</i> ssp <i>scordium</i> , <i>T. montbretii</i> ssp <i>montbretii</i> , <i>heliotropifolium</i>
81. dihidroteugina	<i>T. microphyllum</i> , <i>T. chamaedrys</i> , <i>T. scordium</i> ssp <i>scordium</i>
82. teugnafalodina	<i>T. gnaphalodes</i>
83. 12-Oacetilteugnaf.	<i>T. oxylepis</i>
84. teugracilina A	<i>T. gracile</i>
85. 3-Odeacetilteugr. A	<i>T. polium</i> ssp <i>expansum</i> , <i>T. gracile</i>
86. teugracilina B	<i>T. gracile</i>
87. teugracilina C	<i>T. gracile</i>
88. teugracilina D	<i>T. gracile</i>
89. teugracilina E	<i>T. gracile</i>
90. teukotschina	<i>T. kotschyanum</i> , <i>T. oxylepis</i> ssp <i>marianum</i>
91. teulamiosido	<i>T. lamiifolium</i>
92. teulanigeral	<i>T. lanigerum</i>
93. teulanigeridina	<i>T. lanigerum</i>
94. teulanigerina	<i>T. lanigerum</i>
95. teulanigina	<i>T. lanigerum</i>
96. 20epiteulanigina	<i>T. lanigerum</i>
97. 3deacetil,20epiteul.	<i>T. micropioides</i> , <i>T. polium</i> ssp <i>vincentinum</i>
98. teulepicefina	<i>T. lepicephalum</i>
99. teulepicina	<i>T. lepicephalum</i>
100. 19acetilteulepicina	<i>T. lepicephalum</i> , <i>T. buxifolium</i>

ESTUDIO FITOQUÍMICO

101. teumarina	<i>T.marum</i> , <i>T.massiliense</i>
102. teumassilina	<i>T.massiliense</i>
103. 6,19deacetilteumass.	<i>T.massiliense</i> , <i>T.creticum</i>
104. teumassina	<i>T.massiliense</i>
105. teumicropina	<i>T.micropioides</i>
106. 3acetilteumicropina	<i>T.micropioides</i>
107. teumicropodina	<i>T.micropioides</i>
108. teupernina A	<i>T.pernyi</i>
109. teupernina B	<i>T.pernyi</i>
110. teupernina C	<i>T.pernyi</i>
111. teupernina D	<i>T.pernyi</i>
112. teupestalina A	<i>T.pestalozzae</i>
113. teupestalina B	<i>T.polium</i> ssp <i>capitatum</i>
114. teupolina I	<i>T.lanigerum</i> , <i>T.canadense</i> , <i>T.bicolor</i> , <i>T.polium</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>polium</i> , <i>T.scorodonia</i> , <i>T.scorodonia</i> ssp <i>scorodonia</i> , <i>euganeum</i>
115. 12epiteupolina I	<i>T.bicolor</i>
116. teupolina II	<i>T.polium</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>polium</i>
117. 12epiteupolina II	<i>T.canadense</i> , <i>T.abutiloides</i> , <i>T.lamiifolium</i>
118. teupolina III	<i>T.polium</i> ssp <i>polium</i>
119. teupolina IV	<i>T.polium</i> ssp <i>polium</i>
120. 19acetilteupolina IV	<i>T.polium</i> ssp <i>pilosum</i>
121. teupolina V	<i>T.polium</i> ssp <i>polium</i>
122. teuponina	<i>T.japonicum</i>
123. teupyreinidina	<i>T.pyrenaicum</i>
124. 6deacetilteupyreinidina	<i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i>
125. 6,20bisdeacetilteupyr.	<i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i>
126. teupyreinina	<i>T.pyrenaicum</i>
127. teupyrenona	<i>T.pyrenaicum</i>
128. deacetilteupyrenona	<i>T.micropioides</i>
129. teupyrina A	<i>T.pyrenaicum</i>
130. teupyrina B	<i>T.pyrenaicum</i>
131. teusalvina A	<i>T.salviastrum</i>
132. teusalvina B	<i>T.salviastrum</i>
133. teusalvina C	<i>T.salviastrum</i>
134. teusalvina D	<i>T.salviastrum</i>
135. teusalvina E	<i>T.salviastrum</i>
136. teusalvina F	<i>T.salviastrum</i>
137. 6ahidroxiteuscordina	<i>T.lucidum</i> , <i>T.subspinosum</i> , <i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i> , <i>T.chamaedrys</i> var. <i>chamaedrys</i>
138. 6βhidroxiteuscordina	<i>T.botrys</i> , <i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i> , <i>T.montbretii</i> ssp <i>montbretii</i> , <i>heliotropifolium</i>
139. 6cetoteuscordina	<i>T.bidentatum</i> , <i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i> , <i>T.montbretii</i> ssp <i>montbretii</i>
140. 2ceto,19hidroxiteusc.	<i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i>
141. 12epiteuscordonina	<i>T.bicolor</i>
142. teuscordinon	<i>T.bidentatum</i> , <i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i> , <i>T.lamiifolium</i>
143. 2βhidroxiteuscordinon	<i>T.scordium</i> ssp <i>scordium</i> , <i>T.montbretii</i> ssp <i>montbretii</i>
144. teuscorodal	<i>T.canadense</i> , <i>T.scorodonia</i> , <i>T.scorodonia</i> ssp <i>scorodonia</i>
145. teuscorodol	<i>T.odontites</i> , <i>T.scorodonia</i> , <i>T.scorodonia</i> ssp <i>scorodonia</i> , <i>euganeum</i>
146. 19deacetilteuscorodol	<i>T.botrys</i> , <i>T.oxylepis</i> ssp <i>marianum</i> , <i>T.polium</i> ssp <i>polium</i>
147. teuscorodina	<i>T.kotschyanum</i> , <i>T.scorodonia</i> , <i>T.scorodonia</i> ssp <i>scorodonia</i> , <i>euganeum</i>
148. teuscorodonina	<i>T.kotschyanum</i> , <i>T.scorodonia</i> , <i>T.scorodonia</i> ssp <i>scorodonia</i> , <i>T.oxylepis</i> ssp <i>marianum</i>
149. teuscorólido	<i>T.scorodonia</i> , <i>T.scorodonia</i> ssp <i>scorodonia</i> , <i>euganeum</i>
150. 2ahidroxiteuscorólido	<i>T.scorodonia</i> , <i>T.scorodonia</i> ssp <i>scorodonia</i> , <i>euganeum</i>
151. teuspinina	<i>T.spinosum</i>
152. 19acetilteuspinina	<i>T.spinosum</i>
153. teuvincentina A	<i>T.polium</i> ssp <i>vincentinum</i>
154. teuvincentina B	<i>T.polium</i> ssp <i>vincentinum</i>
155. teuvincentina C	<i>T.polium</i> ssp <i>vincentinum</i>

ESTUDIO FITOQUIMICO

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	
---	---	Ac	=O	α OAc	---	=O	---	CAPITATINA(3)
---	---	Ac	=O	α OH	---	=O	---	7DEACETILCAPITATINA(4)
---	---	Ac	β OAc	α OH	---	=O	---	TEUCAPITATINA(5)
---	---	Ac	=O	OH	C7=C8	=O	---	DERIVADO DIOSFENOL(9)
---	---	Ac	=O	α OH	---	β OAc	α H	ERIOCEPALINA(10)
---	---	Ac	=O	OH	C7=C8	β OAc	α H	DEHIDROERIOCEPALINA(11)
---	---	Ac	=O	α OH	---	β OH	α H	20DEACETILERIOCEPALINA(12)
---	---	Ac	α OH	=O	---	β OAc	α H	ISOERIOCEPALINA(13)
---	---	Ac	α OH	=O	---	β H	α OAc	20EPIISOERIOCEPALINA(14)
---	---	H	=O	---	---	=O	---	GNAPALINA(20)
---	---	Ac	=O	---	---	=O	---	19ACETILGNAPALINA(21)
---	---	Ac	=O	---	---	OAc	H	GNAPALIDINA(19)
---	---	Ac	β OH	=O	---	=O	---	PICROPOLINA(31)
---	---	Ac	β OAc	=O	---	=O	---	6ACETILPICROPOLINA(32)
---	---	Ac	=O	OH	C7=C8	=O	---	PICROPOLINONA(35)
---	=O	Ac	=O	---	---	=O	---	EPOXITAFRICANINA A(37)
---	---	Ac	α OAc	---	---	β OH	α H	TEUBUTILINA B(41)
---	---	Ac	β OH	---	---	=O	---	TEUCJAPONINA A(42)
---	---	Ac	α OH	---	---	=O	---	TEUCJAPONINA B(43)
---	---	Ac	α OAc	---	---	---	---	6ACETILTEUCJAPONINA B(44)
---	=O	Ac	β OH	---	---	β H	α OH	TEUFLAVINA(74)
---	=O	Ac	β OH	---	---	=O	---	OXOTEUFLAVINA(75)
---	β OAc	Ac	β OH	---	---	=O	---	TEUGRACILINA A(84)
---	β OH	Ac	β OH	---	---	=O	---	30DEACETILTEUGRACILINA A(85)
---	β OH	Ac	α OH	---	---	=O	---	TEUGRACILINA B(86)
---	β OH	Ac	α OH	---	---	β H	α OAc	TEUGRACILINA D(88)
---	β OAc	Ac	α OH	---	---	β H	α OAc	TEULANIGINA(93)
---	β OAc	Ac	α OH	---	---	β OAc	α H	20EPI TEULANIGINA(96)
---	β OH	Ac	α OH	---	---	β OAc	α H	3DEACETILEPI TEULANIGINA(97)
---	β OH	H	=O	---	---	=O	---	TEULEPICINA(99)
---	β OH	Ac	=O	---	---	=O	---	19ACETILTEULEPICINA(100)
β OH	---	Ac	β OH	---	---	=O	---	TEUMARINA(101)
---	β OH	Ac	=O	---	---	=O	---	TEUMASSINA(104)
---	β OAc	Ac	α OH	---	---	=O	---	TEUMICROPOLINA(107)
---	---	Ac	α OH	---	---	=O	---	TEUPOLINA I(114)
---	---	H	α OAc	---	---	=O	---	TEUPOLINA II(116)
---	---	H	=O	β OAc	---	=O	---	TEUPOLINA IV(119)
---	---	Ac	=O	β OAc	---	=O	---	19ACETILTEUPOLINA IV(120)
---	β OAc	Ac	α OAc	---	---	β H	α OAc	TEUPIREINIDINA(123)
---	β OAc	Ac	α OH	---	---	β H	α OH	6DEACETILTEUPIREINIDINA(124)
---	β OH	Ac	α OH	---	---	β H	α OH	6.20BISDEACETILTEUPIREINIDINA(125)

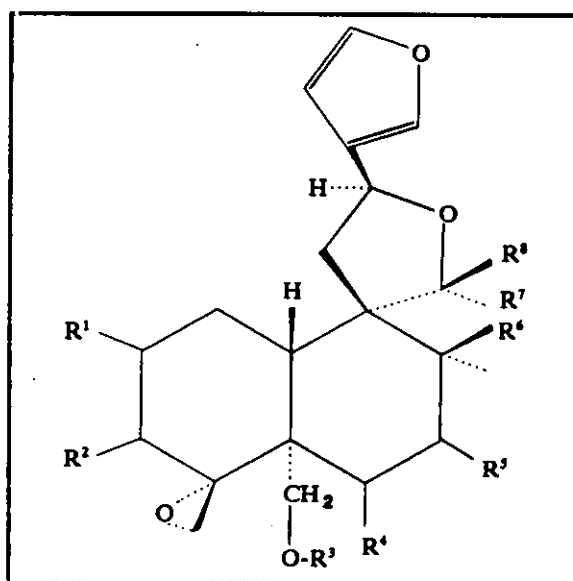


Figura 6.

ESTUDIO FITOQUIMICO

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	
OH	---	α CH2OAc	=O	---	β H	CH3	---	1	H	FRUTICOLONA(16)
OH	---	α CH2OAc	=O	---	β OH	CH3	---	1	H	8 β OH-FRUTICOLONA(17)
=O	---	α CH2OAc	β OH	---	---	CH3	---	1	H	ISOPRUTICOLONA(18)
---	---	α CH2OH	α OH	---	---	CH3	---	2	H	DEACETILAJUGARINA II(8)
---	---	α CH2OAc	α OH	---	---	CH2OAc	OAc	1	H	TEUCOSSINA A(45)
---	---	α CH2OAc	α OAc	---	---	CH2OH	OH	1	H	TEUCRETOL(47)
---	OAc	α CH2OAc	β OH	=O	---	CH3	---	1	OH	TEUCROLIVINA B(59)
---	OH	α CH2OAc	β OH	=O	---	CH3	---	1	OH	TEUCROLIVINA C(60)
---	β OAc	α CH2OAc	β OH	α H β OAc	---	CH3	---	1	H	TEUCROLIVINA D(61)
---	β OAc	α CH2OAc	β OH	=O	---	CH3	---	1	H	TEUCROLIVINA E(62)
---	β OAc	α CH2OAc	β OAc	=O	---	CH3	---	1	H	TEUCROLIVINA F(63)
---	β OH	α CH2OAc	α OH	---	---	CH3	OAc	1	H	TEUGRACILINA C(87)
---	β OAc	α CH2OAc	α OAc	---	---	CH2OAc	OAc	1	H	TEUGRACILINA B(89)
---	---	α CH2OAc	α OAc	=O	---	CHO	OAc	1	H	TEULANIGERAL(92)
---	---	α CH2OH	OH	---	---	---	α H β OH	1	H	TEUMASSILINA(102)
---	---	α CH2OAc	OAc	---	---	---	α H β OH	1	H	DIACETILTEUMAS.(103)
---	β OH	α CH2OH	α OAc	---	---	CH3	OH	1	H	TEUPIRINA B(130)

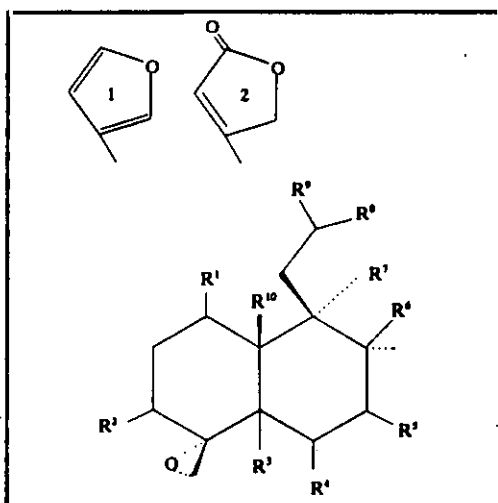


Figura 7.

R1	R2	
---	α OH	6 α HIDROXITEUSCORDINA(137)
---	β OH	6 β HIDROXITEUSCORDINA(138)
β H	=O	TEUSCORDINON(142)
β OH	=O	2 β HIDROXITEUSCORDINON(143)
β OH	α OH	TEUGINA(80)

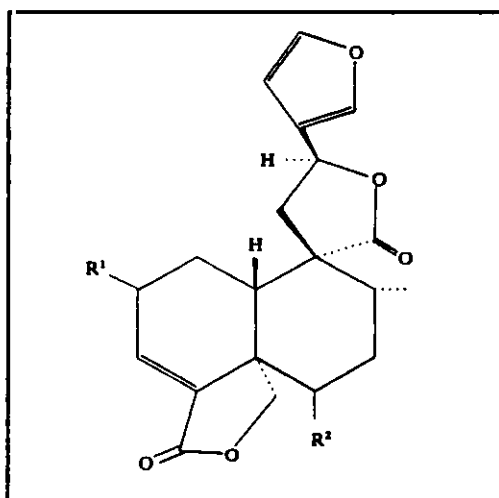


Figura 8.

ESTUDIO FITOQUIMICO

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	
H	1	βH	---	---	αH	αCH2OAc	αOH	---	---	CH3	βOAc	TEULANIOBRINA (miribaceto) (94)
H	1	βH	αOH	---	---	C4=C5	αH	---	---	CH3	=O	TEUCRINA H4 (53)
H	1	C5=C10	αOH	---	αH	---	αH	---	---	CH3	=O	ISOTEUCRINA H4 (56)
H	1	βH	---	---	---	C4=C5	αH	αOH	---	CH3	=O	6EPITEUCRINA A (49)
H	1	αH	βH	---	---	C4=C5	αH	---	---	CH3	=O	TEUCVIDINA (68)
H	1	αH	βOH	---	---	C4=C5	αH	---	---	CH3	=O	2βHIDROXITEUCVIDINA (69)
I	H	αH	---	---	---	C4=C5	αH	---	---	CH3	=O	12EPITEUCVIDINA (70)
H	1	βH	αH	---	---	C4=C5	αH	---	---	CH3	=O	TEUFLINA (78)
I	H	βH	---	---	---	C4=C5	αH	---	---	CH3	=O	12EPITEUFLINA (79)
H	1	αH	---	βOH	---	C4=C5	αH	---	---	CH3	=O	TEUFLIDINA (76)
H	1	βH	---	---	---	C4=C5	αH	---	OH	CH2C1	=O	TEUPERNINA D (111)
H	2	βH	αH	---	---	C4=C5	αH	---	---	CH3	=O	TEUPONINA (122)
H	1	βH	=O	---	---	αCH2OH	---	---	---	CH3	=O	CETO, ONTEUSCORDINA (140)
I	H	βH	---	C3=C4	C3=C4	αCH2OH	αH	---	---	CH3	=O	12EPITEUSCORDONINA (141)
H	1	βH	---	C3=C4	C3=C4	αCH2OH	αH	---	---	CH3	=O	TEUSCORODONINA (148)
H	1	βH	---	---	αOH	αCH2OH	---	---	---	CH3	=O	TEUSPININA (151)
H	1	βH	---	---	αOH	αCH2OAc	---	---	---	CH3	=O	19ACETILTEUSPININA (152)

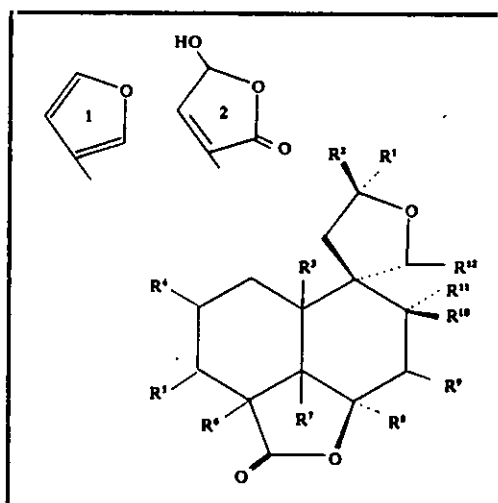


Figura 9.

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	
---	CH2OH	C4=C5	---	---	βOH	---	=O	MONTANINA B (24)
---	CH2OAc	C4=C5	---	---	βOglu	---	=O	TEUFLAVOSIDO (25)
---	---	αOH	βCH2OH	CH2OH	βOH	---	=O	MONTANINA E (29)
---	---	αOH	βCH2OH	CH2OAc	αOH	=O	=O	PICROPOLINOL (34)
---	=O	αOH	βCH2OAc	CH2OAc	=O	---	=O	TAFRICANINA A (36)
---	=O	αOH	βCH2C1	CH2OAc	αOAc	---	=O	TAFRICANINA B (38)
βOH	C3=C4	CH2OH	βCH2C1	CH2OH	βOH	---	=O	TEUSALVINA D (134)
---	C3=C4	CH2OH	---	CH2OAc	βOH	---	=O	TEUSCORODOL (143)
---	C3=C4	CH2OAc	---	CH2OAc	βOH	---	=O	TEUSCORODAL (144)
---	C3=C4	CH2OH	---	CH2OH	βOH	---	=O	19DEACETILTEUSCORODOL (146)
---	---	αOH	βCH2C1	CH2OAc	=O	OH, C7=C8	αHOAc	TEUVINCENINA A (153)
---	C3=C4	CH2OAc	---	CH2OAc	βOH	αOH	=O	LOLINA (156)

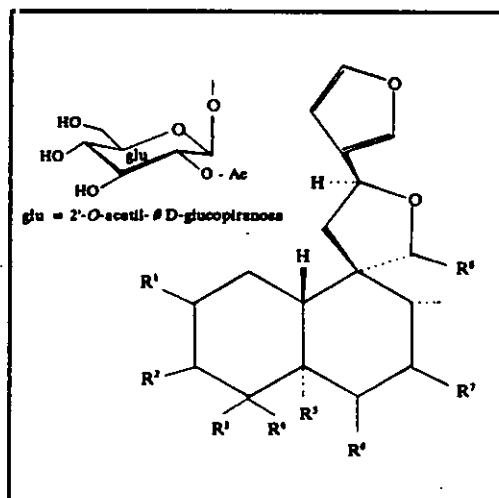


Figura 10.

ESTUDIO FITOQUIMICO

R1	R2	R3	R4	R5	R6	
---	---	β BH	=O	=O	β OH	BIDENTATINA(2)
β OH	---	β C4OC6	=O	β C4OC6	---	CHAMAEDROXIDO(6)
β H	---	β C4OC6	=O	β C4OC6	---	2 DEOXICHAMAEDROXIDO(7)
---	---	---	α H β OH	=O	---	TEUSCORODINA(147)
---	---	---	=O	=O	---	6 CBOTOTEUSCORDINA(139)
---	---	---	=O	α OH	---	TEUCRINA B(50)
C2=C3	---	---	=O	α OH	---	2,3 DEHIDROTEUCRINA B(51)
---	---	β OH	=O	β OH	---	TEUCRINA F(52)
β C2OC3	β C2OC3	β OH	=O	β OH	---	TEUCRINA G(53)
---	---	---	=O	β OH	---	TEUCRINA H2(54)
β OH	---	β H	=O	OH	---	DIHIDROTEUGINA(81)
---	---	---	α H β OH	β OH	---	TEUKOTSCHINA(90)
---	---	β H	β glu	β OAc	---	TEULAMIOSIDO(91)
---	---	β H	=O	=O	C7=C8	TEUPERNINA A(108)
---	---	β H	=O	=O	β OH	TEUPERNINA B(109)
---	---	β H	=O	α H β OH	β OH	TEUPERNINA C(110)
=O	---	---	α H β OH	=O	---	TEUSALVINA A(130)
α H β OH	---	---	α H β OH	=O	---	TEUSALVINA B(131)

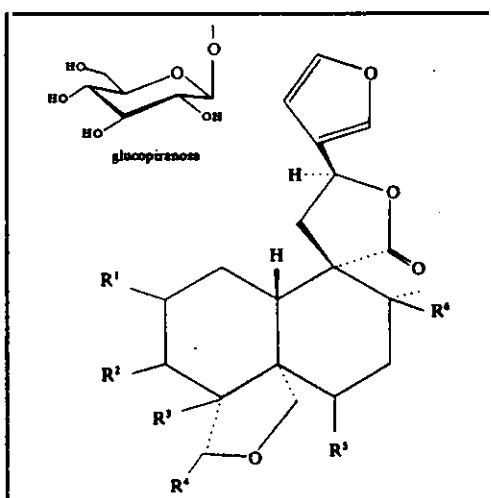


Figura 11.

R1	R2	R3	R4	
---	4,18epoxi	OAc	α OAc	MONTANINA C(26)
---	4,18epoxi	OAc	α OH	12-EPITEUPOLINA I(115)
---	4,18epoxi	OH	α OAc	12-EPITEUPOLINA II(117)
β OAc	4,18epoxi	OAc	α OAc	TEUPYREININA(126)
C3=C4	CH2OH	OH	β OH	TEUSALVINA C(133)

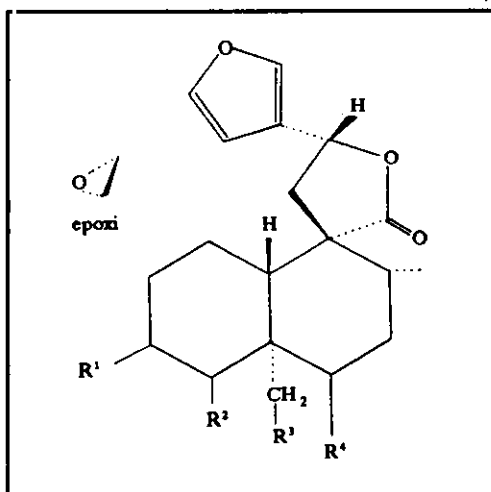


Figura 12.

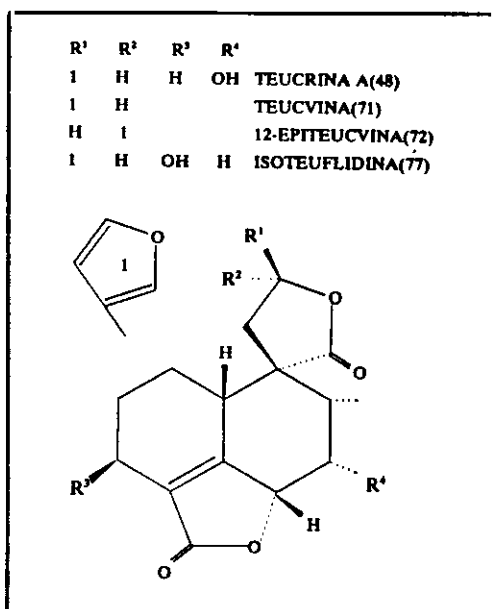


Figura 13.

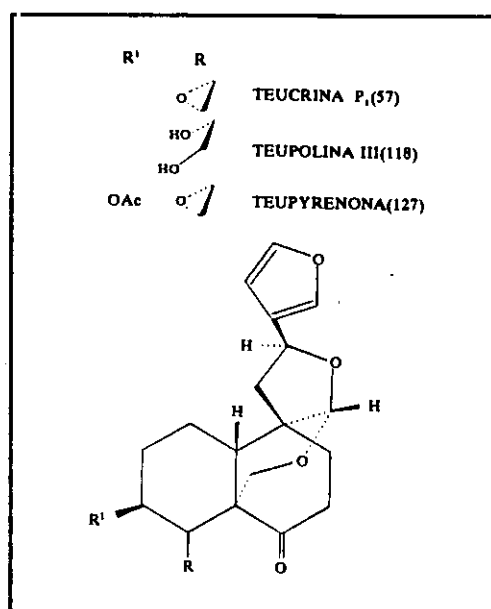


Figura 14.

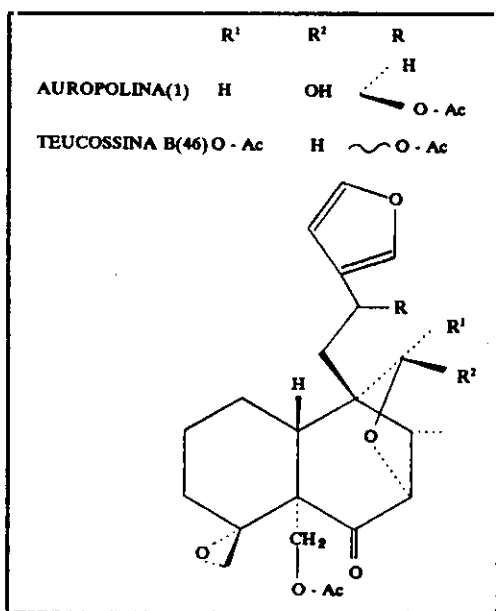


Figura 15.

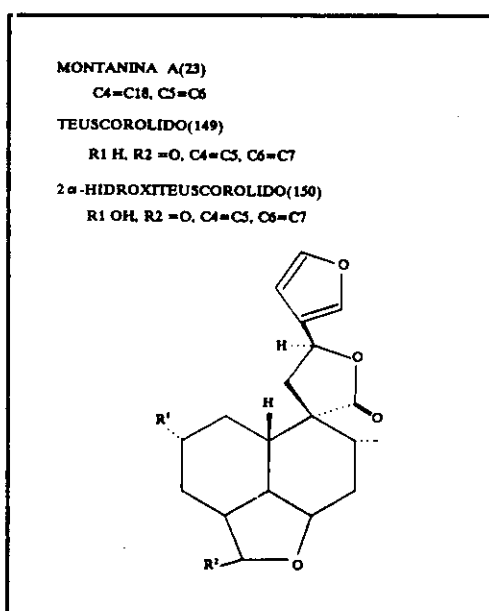


Figura 16.

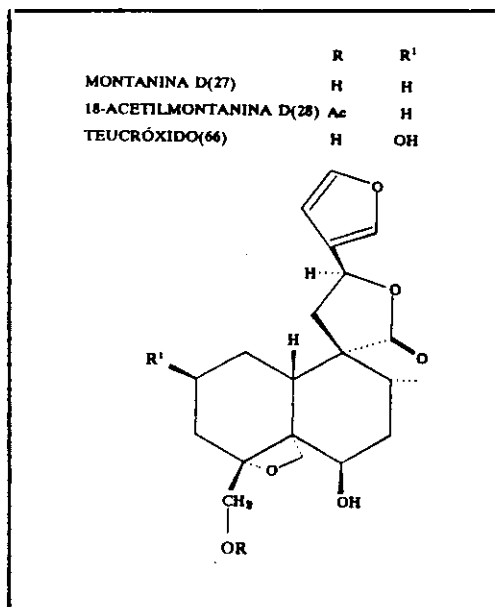


Figura 17.

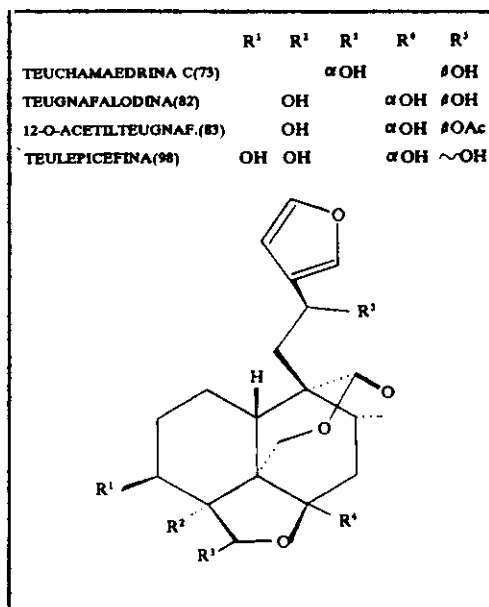


Figura 18.

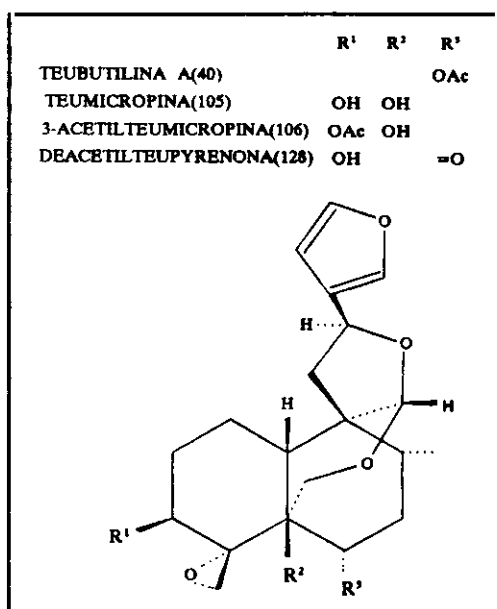


Figura 19.

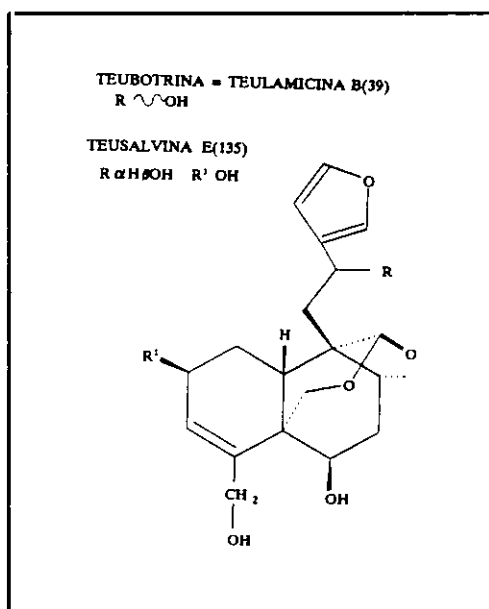


Figura 20.

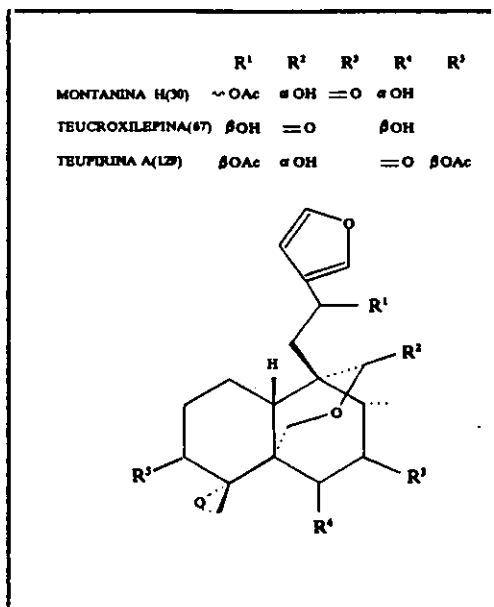


Figura 21.

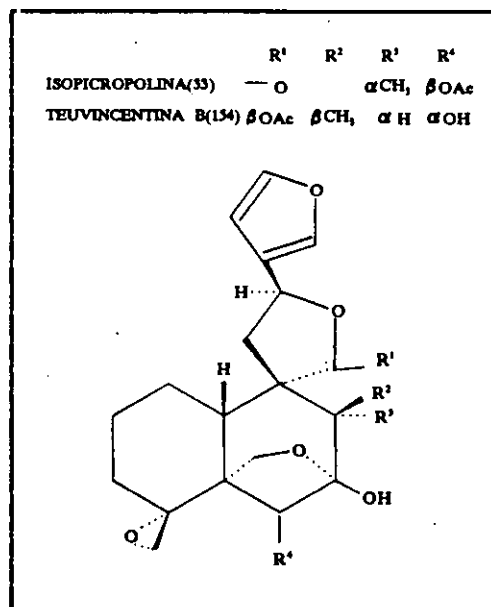


Figura 22.

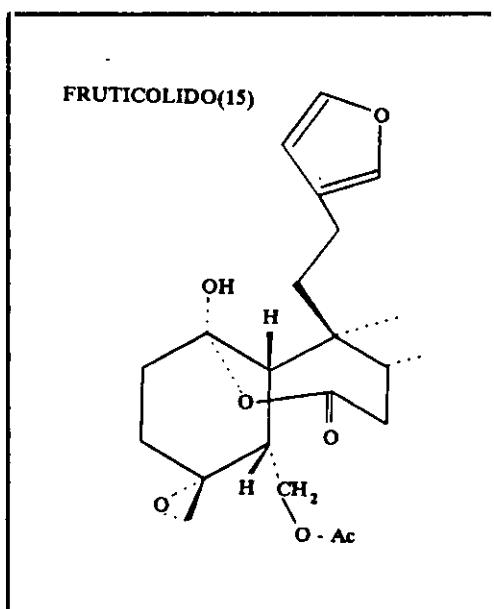


Figura 23.

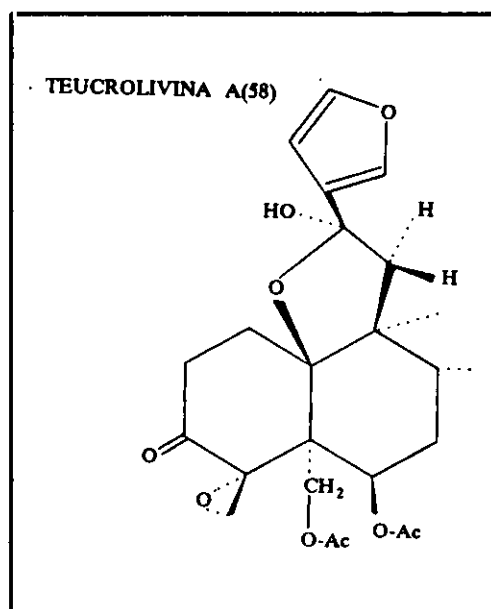


Figura 24.

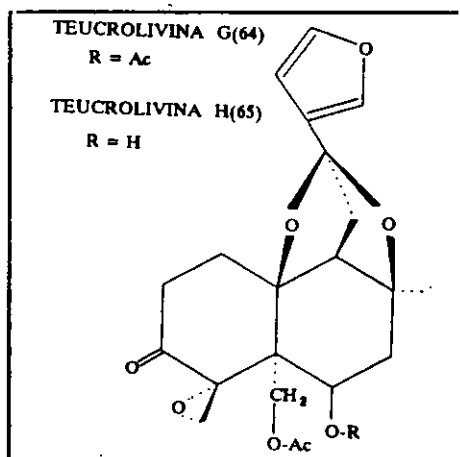


Figura 25.

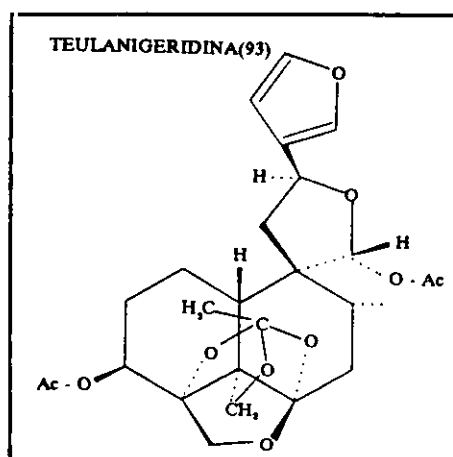


Figura 26.

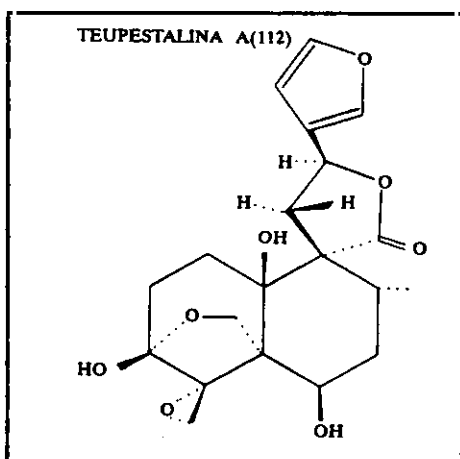


Figura 27.

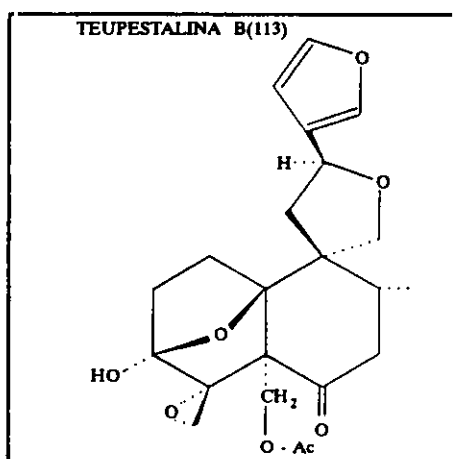


Figura 28.

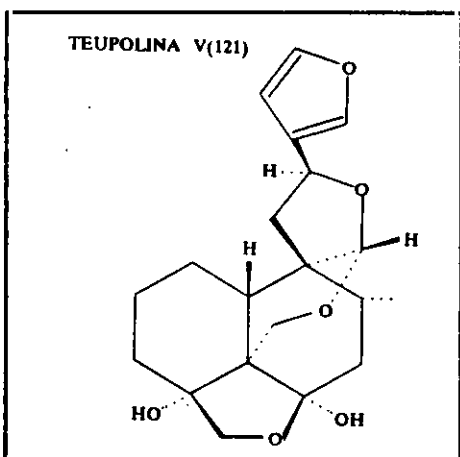


Figura 29.

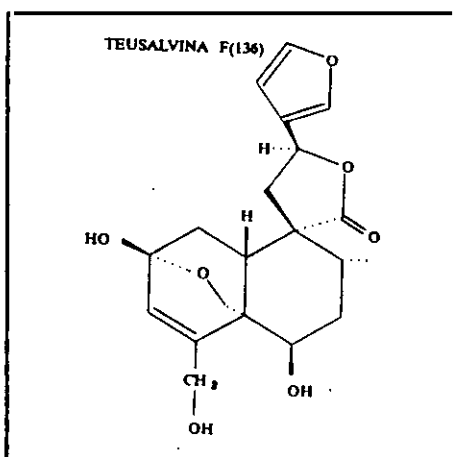


Figura 30.

ABIETANOS EN EL GÉNERO *Teucrium*

Así como han sido descritos más de 100 diterpenos derivados del *neo*-clerodano, no son tan abundantes los abietanos y, en todos los casos, el aislamiento de este tipo de derivados se realizó usando como droga la raíz de estas especies, mientras que los clerodanos se localizan en la sumidad florida.

Los derivados teuvincenona A, B, C y D fueron aislados de la especie *T. polium* ssp. *vincentinum*, recolectada en el Cabo de San Vicente (Portugal). Dos de ellos, el C y D, poseen un esqueleto hidrocarbonado que contiene un anillo ciclopropano entre los carbonos 3, 4 y 18 de la estructura general de los 17(15 → 16)-*abeo*-abietanos. Además de las técnicas espectroscópicas habituales, se empleó la difracción de Rayos X, para el análisis de teuvincenona A y C [58]. Los compuestos teuvincenona E [50], F y G [295] son descritos en la especie *T. fruticans*, originaria de Sicilia (Italia), mientras que el H e I fueron aislados de la raíz de *T. polium* ssp. *expansum*, junto al ferruginol y teuvincenona A y B [295]. En el siguiente esquema se sintetiza la composición en abietanos de este género.

ESPECIE	PROCEDENCIA	ABIETANOS
<i>T. fruticans</i> [50,295]	Sicilia	teuvincenona E
	Italia	teuvincenona F
		teuvincenona G
<i>T. polium</i> ssp. <i>vincentinum</i> [58]	Cabo San Vicente	teuvincenona A
	Portugal	teuvincenona B
		teuvincenona C
		teuvincenona D
<i>T. polium</i> ssp. <i>expansum</i> [295]	Guadalajara	teuvincenona A
		teuvincenona B
	España	teuvincenona H
		teuvincenona I
		ferruginol

R1	R2	R3	R4	R5	R6		
--	=O	α CH β CH β	OH	β CH α H	OH	5=6	--- TEUVINCENONA A
--	---	α CH β CH β	OH	β CH α H	OH	5=6	--- TEUVINCENONA B
--	C3-4-18	β CH β	OH	β CH α H	OH	5=6	--- TEUVINCENONA C
--	C3-4-18	β CH β	--	β CH α H	OH	---	--- TEUVINCENONA D
=O	CH β	CH β	--	β CH α H	OH	3=4, 5=6	--- TEUVINCENONA E
=O	CH β	CH β	--	CH β	OH	3=4, 5=6 15=16	TEUVINCENONA F
--	=O	α CH β CH β	--	β CH α H	OH	---	--- TEUVINCENONA G
--	=O	α CH β CH β	OH	CH β	OH	5=6 15=16	TEUVINCENONA H

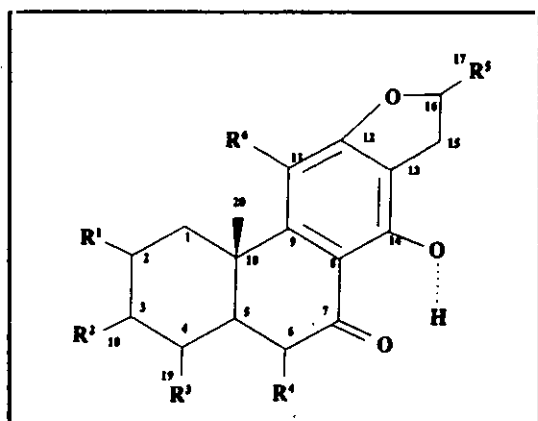


Figura 31.

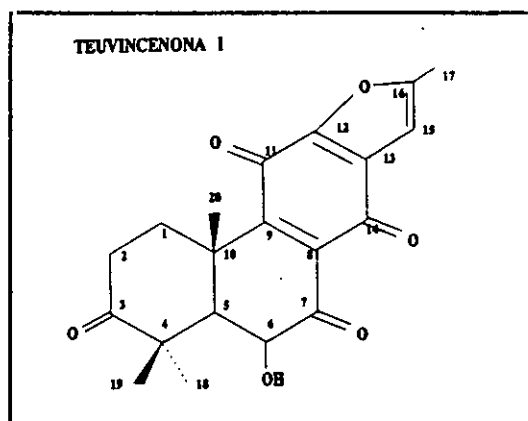


Figura 32.

Probablemente, estos productos son frecuentes en la raíz de especies del género *Teucrium* y la ampliación de estos estudios, es de suponer, conducirá al aislamiento de un gran número de compuestos de este tipo, contribuyendo así a un mayor conocimiento de la fitoquímica del género.

TRITERPENOS Y ESTEROLES EN EL GÉNERO *Teucrium*

Compuestos triterpénicos del tipo α y β -amirina se han puesto de manifiesto en alguna especie del género [100], así como esteroides. Los fitoesteroides son derivados del escualeno de especial interés como materias primas de hormonas esteroídicas (anticonceptivos, antiinflamatorios, anabolizantes...). En la especie *T. polium*, se han detectado el β -sitosterol y estigmasterol, como esteroides predominantes, detectándose también clerosterol [33], campesterol y brassicasterol [327]. El clerosterol ha sido también aislado de la especie *T. bidentatum*, originaria de China, junto a otros compuestos y algunos neo-clerodanos [319].

FLAVONOIDES

Las flavonas, sus heterósidos y flavonoides relacionados suelen ser amarillos, del latín *flavus*=amarillo. Junto con las xantonas y antocianos, son los principales pigmentos hidrosolubles de los vegetales [252], y aparecen en los tejidos jóvenes, donde se encuentran en las células que contienen la savia. Son compuestos polifenólicos, derivados hidroxilados de la cromona o benzo- γ -pirona, que responden a la estructura general $C_6-C_3-C_6$, es decir, dos ciclos bencénicos unidos por un heterociclo central de 3 átomos de carbono, que varía según la naturaleza del flavonoide, y son clasificados en base al grado de oxidación de dicha cadena.

Se clasifican atendiendo al tipo de genina en:

- 1.- Flavonas (2 fenil- γ -cromona)
- 2.- Flavonoles (presencia de -OH en 3)
- 3.- Flavanonas
- 4.- Flavanonoles (oxidación de flavanonas)
- 5.- Isoflavonas
- 6.- Chalconas (apertura del anillo de pirano)

Compuestos relacionados:

- 7.- Antocianos (reducción de flavonas)
- 8.- Catequinas (reducción del flavilio)
- 9.- Auronas (ciclación de chalconas)
- 10.- Xantonas (benzo- γ -pironas)
- 11.- Rotenoides (derivan de isoflavonas)

Generalmente aparecen en forma heterosídica, y aunque no es raro encontrar C y diC-glicosilflavonoides, son más frecuentes los O-heterósidos. La unión de la osa se realiza, por lo común en el hidroxilo en 7 en flavonas y flavanonas; por el hidroxilo de la posición 3, en el caso de los flavonoles, aunque si existe una segunda molécula de azúcar, se fijará también en el hidroxilo del C7. Los más numerosos son flavonas y flavonoles,

diferenciándose entre sí por modificaciones del núcleo, por la presencia de grupos fenólicos, en ocasiones metoxilados, y por las osas unidas al aglucón. Los azúcares que aparecen suelen ser aldosas (como excepción aparece la D-fructosa), siendo la D-glucosa el más frecuente, seguido de D-galactosa, L-ramnosa y, en ocasiones, oligósidos de 2 y 3 unidades, lineales o ramificados. También puede estar acilado el resto azucarado (D-glucurónico). Pueden aparecer hasta 5 sustituyentes en la estructura general, que ocuparán las posiciones 7, 5, 4', 3' y 5', por orden de preferencia.

Farmacológicamente, se reconoce de los flavonoides la acción vitamínica P, atribuyéndose las propiedades del factor P, sin el cual no puede actuar el ácido ascórbico en ciertas manifestaciones hemorrágicas del escorbuto, a diversos polifenoles, entre los que se encuentran los flavonoides. Estos compuestos actúan disminuyendo la fragilidad capilar. Por otro lado, también se han comprobado acciones diuréticas, coleréticas, hipotensoras antihemorrágicas [311] y antiespasmódicas, de drogas ricas en flavonoides. Algunas de estas especies vegetales han demostrado una importante actividad estrogénica. Estudios más recientes, implican a ciertos flavonoides en la inhibición de la agregación plaquetaria [361] y de la respuesta inflamatoria [6,150,227,357,358,359,360,363,367] -posiblemente debido a que interfieren en el metabolismo del ácido araquidónico- e incluso, se les atribuyen propiedades antiulcerogénicas [196,249,359,360].

COMPUESTOS FLAVÓNICOS EN EL GÉNERO *Teucrium*

La mayoría de los flavonoides encontrados en este género, muestran el anillo A trisustituido, como 5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavonas, con diferentes sustituyentes en el anillo B. Idéntico patrón de sustitución en el anillo A ha sido detectado en otras especies de la familia *Lamiaceae*, de los géneros *Salvia* y *Rosmarinus*, y 5,6-dihidroxi-7-metoxiflavonas aparecen con frecuencia en especies de los géneros *Thymbre*, *Nepeta*, *Galeopsis* y *Ballota*. Otros géneros como *Sideritis*, *Ocimum* y *Satureja* presentan el anillo A tetrasustituido.

Se han detectado más de 25 compuestos flavónicos distintos en el género *Teucrium*, entre geninas y glicósidos flavónicos. Cirsiliol [56,128,186,255,330,354] y cirsimaritina [56,128,278,330,353,354,100] se encuentran presentes en la mayoría de las especies estudiadas. A nivel de secciones los más importantes marcadores serían la salvigenina [128,255,278,286,330,353,100] característica de especies de la sección europea *Polium* [128] y 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona [128,330], frecuente en las secciones *Teucris*, *Stachybotrys* y *Chamaedrys*, aunque esto no implica que puedan darse, ocasionalmente, en especies pertenecientes a otras secciones. La luteolina [128,152,194,255,330,353,331] y la apigenina [128,152,330,331,353,354] se hallan prácticamente en todas las especies, aunque en ocasiones sólo se detectan trazas. Los flavonoles son poco frecuentes en la familia *Lamiaceae*, sin embargo, se ha puesto de manifiesto la presencia del kaempferol en el *T. polium* [353] y quercetina e isorhamnetina en las especies pertenecientes a la sección *Teucris* [128,152]. Además, la isorhamnetina es la primera vez que se detecta en esta familia [128].

Con respecto a los glicósidos, 2-vicenina se encuentra en todas las secciones europeas, con la excepción de *Scordium*, así como la apigenina 7-glucósido y 7-rutinósido, aparecen en todas las secciones, excepto en *Teucris*.

Los glucósidos de luteolina aparecen en todas las especies, aunque a veces sólo se detecten trazas. En la especie *Teucrium arduini* el 4'-glucósido de cirsimaritina es el componente mayoritario, y es tan sólo la segunda vez que se pone de manifiesto en la naturaleza [128]. La eupatorina tan sólo se detecta en las especies *T. pseudochamaepitys* [330] y *T. polium* [354] y la 6-metoxigenkwanina en *T. polium*, recolectado en el estado de Qatar, Golfo de Arabia [255].

La sección *Teucris* es la que está más claramente definida por el momento, presentando sus especies un mismo patrón flavónico. La salvigenina aparece como excelente marcador de la sección *Polium* y las tetrametoxiflavonas se encuentran presentes en el 70% de las especies de la sección *Chamaedrys*.

Las 8-hidroxi flavonas no se detectan más que en especies de esta última sección, confirmando la estrecha relación morfológica existente entre especies de muy distinta procedencia geográfica, como son el *T. webbianum* y *T. chamaedrys*.

Se ha observado que la diferencia que existe, en cuanto a la composición cualitativa en compuestos flavónicos, entre subespecies, es mínima, como en el caso de *T. pumilum* ssp. *pumilum* y ssp *carolipau* [128], o incluso no existe, como ocurre con las subespecies *divaricatum* y *villosum* del *T. divaricatum* [128], o en el caso de las variedades *pilosum* y *alba* del *T. polium* [255].

Con respecto a la especie objeto de estudio en esta memoria, *Teucrium buxifolium* se ha puesto de manifiesto la presencia de cirsiol, cirsimaritina, cirsilineol, salvigenina, luteolina, 6-hidroxi luteolina, 2-vicenina, cosmosiina (trazas), 5,7,4'-trihidroxi flavona-7-O-rutinósido, cinarósido, 5,7,3',4'-tetrahidroxi flavona-7-O-rutinósido, 5,6,7,3',4'-pentahidroxi flavona-7-O-glucósido y 5,6,7,3',4'-pentahidroxi flavona-7-O-rhamnósido [128].

OTROS COMPUESTOS EN EL GÉNERO *Teucrium*

El tritriacontano, con estructura de hidrocarburo, fue aislado de la especie *T. bidentatum*, originaria de China, junto a algunos *neo-clerodanos* y el *clerosterol* [319].

La especie *T. decipiens* ha sido la única, dentro del género, que está exenta de la presencia de *neo-clerodanos*, y en contrapartida presenta una mezcla compleja de **glucósidos** y **compuestos poco usuales**, como la *halleridona* o el 4-hidroxi-4-(2-hidroxietilciclohexanona), no detectados hasta el momento en otras especies del género, ni en la propia familia *Lamiaceae* [23].

El *teucríosido* se ha obtenido de la fracción hidrosoluble del extracto metanólico de *T. chamaedrys*. Este compuesto presenta una estructura de *fenilpropanoglicósido* de fórmula $C_{34}H_{44}O_{19}$ [120].

Tan sólo en una especie, *T. oliverianum*, ha sido detectada la presencia de **glucósidos cardiotónicos** [146], compuestos de rara aparición y distribución restringida a muy pocas familias botánicas y que en el Reino Animal, de forma excepcional, aparece en sapos.

Numerosas especies de este género presentan en su composición **taninos** y también se han identificado, entre sus componentes, **ácidos fenólicos**, entre los que pueden citarse al *ácido málico*, *clorogénico* y *cafeico* [98,134].

Se hace referencia a la presencia de **saponinas** en las especies más estudiadas del género, *T. chamaedrys* [234,291], *T. oliverianum* [146], *T. marum* y *T. scorodonia* [134].

MATERIAL Y MÉTODOS

La especie *Teucrium buxifolium*, objeto de esta memoria, es una especie casi sin explorar, tanto en su composición fitoquímica, como en su actividad farmacológica, como ha podido observarse en la bibliografía consultada. Los estudios que hasta el momento se han llevado a cabo sobre la misma, así como el escaso conocimiento de que se dispone con respecto a su composición química, no permiten concretar a que compuesto/s químicos podría atribuirse la actividad antiinflamatoria por la que es empleada en medicina popular. Es por ello, que se hace necesario un estudio experimental con respecto a la composición cualitativa de la misma, y previamente se realiza el tratamiento del material vegetal, para adecuarlo a su posterior estudio a nivel fitoquímico, así como farmacológico.

TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Para llevar a cabo los ensayos experimentales de esta Memoria, se abordan, en primer lugar, una serie de operaciones destinadas a la obtención, acondicionamiento y preparación del material vegetal objeto de estudio.

RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

La especie *Teucrium buxifolium* posee una distribución tan esporádica y restringida que la recolección del material vegetal hubo de realizarse en años consecutivos, a fin de obtener la masa crítica necesaria para el desarrollo experimental de este trabajo, pero respetando siempre la población vegetal, con el objetivo de no agotarla.

Curiosamente esta especie, conocida por el pueblo valenciano como 'teucrí de roca', parece tener especial predilección por las paredes rocosas y abruptas en que se asientan viejos castillos y monasterios, pero sólo por aquellas que están soleadas y bajo la influencia de la brisa marítima.

La sumidad florida, que constituye la droga de esta planta, fue, de hecho, recolectada en el cerro del Santuario de la localidad valenciana de Cullera y en la provincia de Alicante en las laderas del Castillo de Santa Bárbara, situado en el Monte Benacantil, en el Castillo de Sax y en el Castillo de San José de Castell de Guadalest. La recolección se efectuó en los meses de abril y mayo, de 1990 a 1993, coincidiendo siempre con el período de máxima floración.

En todas las ocasiones el material vegetal fue identificado, gracias al Departamento de Botánica de esta Facultad de Farmacia, como *Teucrium buxifolium* Schreber. Los ejemplares testigo correspondientes fueron convenientemente prensados, depositándose en el herbario de dicho Departamento, con los números de especimen MAF-136648 y MAF-137691.

DESECACIÓN

Una vez separados los ejemplares testigo, el resto del material vegetal se somete a desecación, con el fin de eliminar el agua de vegetación e impedir así cualquier tipo de alteración en la composición de la planta. Las sumidades recolectadas se desecaron extendiéndolas sobre un lecho seco, de forma que ofreciesen la mayor superficie posible, en una habitación ventilada, a temperatura constante, entre 20 y 25°C y protegidas de la incidencia directa de los rayos solares, que podrían acelerar el proceso, secando y endureciendo las capas superficiales del material vegetal, impidiendo la evaporación del interior y provocando, además, la alteración de sus pigmentos naturales.

MOLTURACIÓN

Una vez desecado el material vegetal, se separan de la sumidad florida los restos de raíces, tierra y otros elementos ajenos, como por ejemplo la pinocha -que en este caso acompaña con frecuencia a la planta-, y que por supuesto, no constituyen la droga. Para facilitar el manejo del material

vegetal y la obtención de los extractos de la planta, la droga desecada se moltura en un molino de martillos, modelo Royal Triumph, empleando un tamiz de 2mm de diámetro, con el objeto de conseguir un tamaño de partícula homogéneo y adecuado, de manera que no se formen barroos que podrían dificultar los procesos de extracción.

CONSERVACIÓN

Las muestras, desecadas y pulverizadas, se conservan en recipientes herméticos de cristal topacio, resguardadas, por tanto, de la humedad y la luz solar, ya que en condiciones óptimas de luz, temperatura y humedad, podría producirse el desarrollo de organismos vivos -mohos, insectos, arácnidos y bacterias- que utilizarían la planta como fuente de nutrición.

PROCESOS DE EXTRACCIÓN

Los ensayos de valoración biológica se han realizado sobre la infusión de la planta -por ser la forma de uso popular- y sobre los extractos orgánicos de la misma, obtenidos mediante un proceso continuo y en caliente.

Extracción Acuosa

La forma medicamentosa de uso popular de esta planta, está constituida por la infusión de las sumidades floridas, por lo que se preparó ésta al 10%, según las recomendaciones de la Farmacopea Oficial Española (9ª ed., p. 580): se humectan homogéneamente 100g de droga, desecada y pulverizada, con un volumen de 50mL de agua, procurando que no se formen grumos. Se tapa el recipiente y se deja reposar 15 minutos. Se vierten sobre la planta humedecida 900mL de agua a temperatura de ebullición, manteniéndose en baño maría hirviendo durante 5 minutos y agitando con una varilla de vidrio. Se retira del baño, se tapa y se mantiene en maceración 30 minutos, agitando. Posteriormente, se decanta sobre algodón y se lava

éste con agua suficiente, reuniendo las aguas de lavado hasta completar el volumen a 1000mL.

Para facilitar el manejo de la infusión en las distintas valoraciones farmacológicas, fue sometida a un proceso de liofilización, que permite la conservación e inmediata regeneración del extracto acuoso, en el momento de su uso, lo que evitará el crecimiento microbiano y de mohos. Para ello, se empleó un liofilizador de laboratorio, Liolabor 7 (TELSTAR).

El rendimiento obtenido en la liofilización de la infusión al 10% alcanzó un valor del 12.1%, con respecto a peso de planta seca.

Extracción Orgánica

El arrastre de los componentes químicos de la planta se ha realizado, además, mediante un proceso de extracción continua en caliente, en aparato soxhlet, sistema que consigue, con la mínima cantidad de disolvente, extraer el máximo de principios de una droga, por combinación de dos procesos extractivos, maceración y percolación [66].

Se ha realizado una extracción sucesiva, con solventes orgánicos en orden de polaridad creciente, empleando para ello hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Este sistema de extracción sucesiva, directamente de la droga, es considerado como la técnica idónea en aquellos estudios en los que el principal objetivo consiste en la búsqueda de principios con actividad biológica, independientemente de su naturaleza química, ya que estos constituyentes se separan en función de su solubilidad, agrupando en extractos prepurificados los principios responsables de la actividad farmacológica.

Una cantidad, exactamente pesada, de polvo de droga se introduce en un cartucho cilíndrico de papel de filtro, de tamaño adecuado al cuerpo intermedio del soxhlet. El material vegetal se humecta con el primer disolvente a emplear, hexano, y se mantiene en maceración durante 24h; posteriormente, se procede a la extracción en caliente, hasta agotar el

material vegetal, es decir hasta que la droga no ceda color y por tanto, los líquidos extractivos sean incoloros.

El marco resultante de esta extracción, el cartucho con la droga, se deja secar y se mantiene en campana extractora, hasta eliminar los restos de disolvente, interpuestos entre las partículas del polvo de la planta. Una vez seco, se somete de nuevo a extracción con el siguiente disolvente y así sucesivamente.

Los líquidos extractivos se concentran a presión reducida y temperatura controlada, en un rotavapor Büchi 110, hasta consistencia siruposa y se llevan a campana de extracción, para su completo secado.

Rendimiento de los Procesos de Extracción

Los rendimientos obtenidos, expresados porcentualmente con respecto al peso de planta seca, para cada uno de los extractos, se reflejan en la Tabla I:

EXTRACTO	RENDIMIENTO
Hexánico	2.85 %
Diclorometano	2.13 %
Acetato de Etilo	1.47 %
Metanólico	12.86 %

Tabla I. Rendimiento de los extractos orgánicos de *Teucrium buxifolium*, obtenidos mediante aparato soxhlet, expresados en porcentaje con respecto a peso de planta seca.

El hexano es un disolvente apolar, por lo que es capaz de arrastrar compuestos liposolubles, como son las grasas, esencias, resinas, colorantes y alguna genina. Restos de resinas y aceites esenciales, y geninas serán definitivamente solubilizados por el siguiente solvente, diclorometano. El acetato de etilo se enriquece en heterósidos saponínicos y esteroides, y aunque también disuelve algunos flavonoides y alcaloides, éstos en su mayoría se encontrarán en el extracto metanólico.

SCREENING FITOQUÍMICO DE *Teucrium buxifolium*

Al tratarse de una especie sobre la que prácticamente no existen estudios sobre su composición química, y con el fin de realizar una búsqueda más racional de los principios activos de la especie, se abordó un screening fitoquímico de carácter general, que pretende poner de manifiesto su composición cualitativa. Este estudio está basado en las reacciones generales de caracterización de los distintos grupos químicos más abundantes del Reino Vegetal, entre las que se pueden citar reacciones de coloración y precipitación, técnicas sencillas de fluorescencia, formación de compuestos de adición, oxidación y técnicas de cromatografía en capa fina.

CARBOHIDRATOS

Se trata de los componentes más abundantes de las plantas y animales. Juegan diversos papeles en los seres vivos, como fuente de reserva y transporte energético en hombres y animales, constituyente de membranas en plantas, microorganismos... Pueden existir en forma de carbohidratos sencillos, como los azúcares, constituyendo estructuras más o menos complejas y de peso molecular elevado, como el almidón y celulosa, e incluso polisacáridos heterógeneos, como las gomas y mucílagos.

AZÚCARES

Los carbohidratos sencillos pueden encontrarse en los vegetales, en forma libre o combinada, formando heterósidos de muy diversa naturaleza. Existe una gran variedad de osas vegetales: pentosas, hexosas, desoxihexosas, ácidos urónicos, polioles, éteres y ésteres de osas... Generalmente, son poco solubles en alcohol, pero hidrosolubles. El ensayo cualitativo de los mismos, se basa en el hecho de que poseen poder reductor todos los monosacáridos y muchos disacáridos, pudiendo los glúcidos no reductores, adquirir dicha capacidad, tras una hidrólisis ácida.

Azúcares Libres

Para determinar la presencia de azúcares libres en la planta se realiza una prueba cualitativa, basada en la reducción ejercida por los mismos sobre las sales de metales pesados, en medio alcalino. El reactivo de Fehling es, sin duda, el más utilizado de cuantos se emplean en la caracterización de glúcidos, aunque también podrían citarse a Molisch, Seliwanoff, Keller-Killiani...

Se parte de, aproximadamente, 10g de muestra y se realiza una extracción en caliente, con 150mL de agua. Posteriormente, se deja enfriar el extracto acuoso y se filtra. Se pasan 5mL del líquido filtrado a un tubo de ensayo, y se añaden, en igual cantidad, la solución de Fehling A y solución de Fehling B, y se calienta suavemente, hasta ebullición. Aparecerá un precipitado rojo ladrillo intenso, correspondiente al óxido cuproso formado en la reducción, indicativo de la presencia de azúcares libres en la planta.

Resultado: Como era de esperar, el ensayo arrojó un resultado claramente positivo, al obtenerse el precipitado rojo oscuro, propio del ión Cu^{2+} , reducido por los azúcares, presentes en forma libre en la droga.

Azúcares Totales

Se realiza, simultáneamente, una determinación de azúcares en forma libre y de aquellos que se encuentran formando combinaciones heterosídicas, para lo cual es preciso separarlos de las correspondientes geninas, mediante una hidrólisis ácida.

Se toma un matraz Erlenmeyer, provisto de un refrigerante de reflujo, y se somete a 20g de planta seca, a ebullición en una solución de HCl al 5%, durante 4h.

Se deja enfriar y se extraen, en ampolla de decantación, con éter, las geninas hidrolizadas de los azúcares, que quedarán en la fase acuosa. Esta solución acuosa se calienta a baño maría, con el fin de eliminar el posible éter retenido.

Una alícuota del líquido recogido es sometida a neutralización, con NaOH al 20% (incluso es conveniente alcanzar un pH ligeramente alcalino), sobre la que se verifica la reacción de Fehling.

Resultado: Tras la hidrólisis a que es sometido el polvo seco de la planta, es de suponer que, en caso de existir azúcares en forma heterosídica, el precipitado de Cu^{2+} que se obtiene ha de ser de mayor consistencia que antes, lo cual se verifica en este caso.

MUCÍLAGOS

Con los términos de gomas y mucílagos, se agrupan macromoléculas osídicas de origen vegetal, polisacáridos heterogéneos constituidos por ácidos urónicos (galacturónico, manurónico, glucurónico), hexosas y pentosas [375]. Mientras que las gomas son de origen patológico, exudando de los órganos vegetales tras un traumatismo, con el fin de recubrir así la herida, los mucílagos, por el contrario, se consideran constituyentes celulares normales, que se forman en el metabolismo natural de la planta, por transformación de las paredes celulares o a expensas de la fécula almacenada en los protoplasmas. Con el agua forman geles o soluciones coloidales, viscosas y no adherentes. Precipitan en alcohol, acetato básico y neutro de Pb, con sales de Ca, Ba (metales en general) [276].

Para su investigación, se prepara un extracto acuoso al 5% y se filtra. A 2mL del filtrado se adicionan 16mL de alcohol de 96°, formándose un precipitado floculoso, en caso de existir mucílagos en el material vegetal.

Otro ensayo cualitativo, comúnmente realizado, consiste en dejar enfriar el extracto acuoso filtrado en caliente, y comprobar cómo aumenta su viscosidad, debido a que los mucílagos experimentan hinchamiento con el agua fría, formándose soluciones coloidales.

Resultado: A pesar de obtener un precipitado más o menos floculoso, aunque poco abundante, en el primer ensayo realizado, no se apreciaba una mayor viscosidad del extracto acuoso, por lo que no puede afirmarse la presencia de mucílagos en la droga.

COMPUESTOS FENÓLICOS

Compuestos ampliamente repartidos en la naturaleza, en la mayor parte de los grupos de compuestos naturales poseedores de anillos aromáticos. Entre ellos se citan a los ácidos fenoles, taninos, cumarinas, antraquinonas, flavonas y derivados antociánicos [252].

ÁCIDOS FENOLES

Constituyen un grupo de derivados fenólicos de constitución sencilla, que se hallan en los vegetales, bien en forma libre o combinada, en forma de ésteres o constituyendo moléculas heterosídicas. Son compuestos aromáticos sencillos, con función ácida y numerosos grupos hidroxilo que les confieren solubilidad en agua y alcohol [127,252].

Se pueden clasificar en dos tipos: derivados del ácido benzoico con 7 átomos de carbono (C_6-C_1) y los derivados del ácido cinámico, de 9 átomos de carbono (C_6-C_3).

Estos dos tipos de compuestos se estudian conjuntamente, debido a que ambos poseen función ácida en forma de ésteres. Por otro lado, se cree que los ácidos benzoicos derivarían de los ácidos cinámicos. Es importante el

hecho de que haya posibilidad de separarlos e identificarlos de forma simultánea, tras una hidrólisis ácida o alcalina de los extractos vegetales.

Derivados del Ácido Benzoico

Los ácidos benzoicos están muy repartidos en Angiospermas y Gimnospermas, según indican Harborne y Simonds. El ácido p-hidroxibenzoico, vainílico y sirínico (Figura 33) se encuentran en la lignina de los vegetales, de la cual se liberan por hidrólisis alcalina.

Los ácidos gálico y protocatéquico tienen una función y un origen muy distinto, aún en la misma planta. El ácido protocatéquico es un ácido muy repartido en los vegetales, mientras que el ácido gálico es más raro y suele presentarse como su dímero, el ácido elágico. Los ácidos gálico y elágico juegan un papel preponderante en la estructura de ciertos taninos, donde se pueden encontrar en forma libre o formando ésteres, que se liberan por hidrólisis ácida.

De forma ocasional, pueden también encontrarse el ácido p-metoxibenzoico y otros ácidos completamente metoxilados y por tanto, sin función fenol.

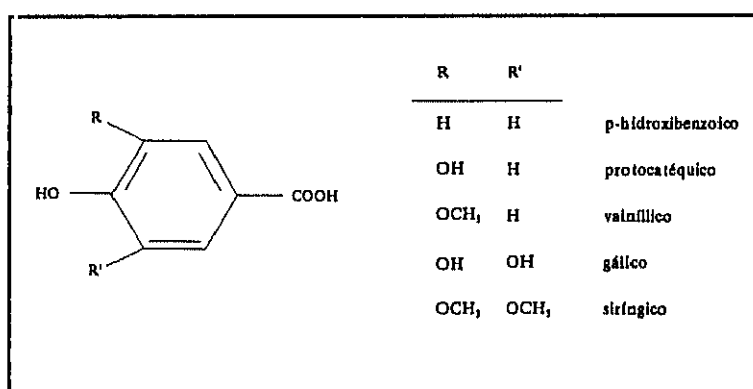


Figura 33. Ácidos fenoles derivados del ácido benzoico

Los ácidos salicílico y gentísico son orto-hidroxilados, se encuentran, sobre todo, como ésteres y son menos frecuentes (Figura 34).

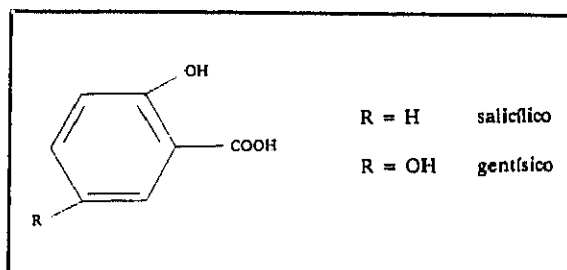
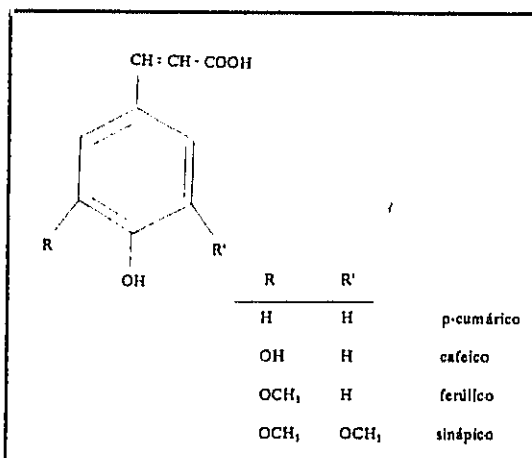


Figura 34. Ácidos fenoles derivados del ácido salicílico

Derivados del Ácido Cinámico



Los más conocidos y repartidos en los vegetales son el ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico (Figura 35).

Figura 35. Ácidos fenoles derivados del ácido cinámico

El ácido cinámico, no sustituido, es difícil de identificar, ya que no es fluorescente al UV y no reacciona con los reveladores típicos de fenoles naturales. El ácido o-cumárico posee un hidroxilo, en orto a la cadena carbonada y se cicla fácilmente, dando la cumarina, siendo los derivados cumarínicos constituyentes más frecuentes de los vegetales, que poseen un heterociclo oxigenado de 6 átomos de carbono, unido al núcleo bencénico, y que están incluidos entre los derivados polifénolicos.

Derivadas de los ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico existen otras cumarinas, como son la umbeliferona, aesculina, esculetina...

El ácido p-cumárico se halla en forma de éster en algunas flavonas y antocianos. El ferúlico se encuentra en forma libre o éster en algunas gomo-resinas. El sinápico está presente en las mostazas y el ácido caféico se manifiesta en numerosos vegetales, libre o en combinación con el ácido quínico, formando el ácido clorogénico, isoclorogénico y la cinarina.

Harborne y Corner estiman que las combinaciones de los ácidos cinámicos juegan un papel importante, como intermediarios de las reacciones del metabolismo. Sólo se han encontrado 3 azúcares formando ésteres del cinámico: glucosa, gentobiosa y rutinosa; aunque pueden existir otros, desconocidos.

Los ácidos fenoles suelen poseer marcada actividad fisiológica, como, el ácido salicílico, que es antiséptico, antitérmico y analgésico, así como el salicilato de metilo es antirreumático. El gálico es astringente, el cafeico y clorogénico son colagogos...[234]

Por otro lado, poseen actividad antifúngica de considerable importancia, contra los parásitos de los vegetales.

Extracción

Se pueden seguir dos métodos:

1.- Se prepara un extracto acuoso al 5%, por maceración en frío, durante 24h. Una parte de este extracto se agota con éter etílico, al que pasarán los ácidos fenoles libres. En la fase acuosa quedarán los fenoles combinados. Se evapora, a residuo seco, la fracción etérea y se recoge con alcohol. La fracción acuosa se somete a hidrólisis ácida con H_2SO_4 al 10%, después se enfría y se extrae con éter etílico, hasta su agotamiento. La fase etérea se evapora a residuo seco y se recoge con alcohol [252].

2.- Se prepara un macerado acuoso, a temperatura ambiente, durante varias horas, con agitación frecuente, de forma que quede un líquido extractivo al 10%. A partir del extracto acuoso se prepara, con parte del mismo, un extracto etéreo y se realizan una hidrólisis ácida y otra alcalina [252], finalmente se dispondrá de:

* Extracto acuoso: se concentra parte en rotavapor, hasta obtener un pequeño volumen.

* Extracto etéreo: una alícuota del macerado es extraída, varias veces, con éter sulfúrico en ampolla de decantación. Los líquidos etéreos se evaporan a sequedad y el residuo se toma con alcohol.

* Hidrólisis ácida: es utilizada para así romper los enlaces éteres (C-O-C) de las combinaciones heterosídicas y liberar los ácidos fenoles. A unos 10mL del extracto acuoso se añaden 30mL de HCl 2N y se mantiene a ebullición a reflujo, durante 1h. Tras enfriar, se realiza una extracción con éter, hasta agotamiento. Los líquidos etéreos se dejan evaporar, hasta residuo seco y se recoge éste en alcohol.

* Hidrólisis alcalina: se lleva a cabo con el fin de romper los enlaces éster (C-OO-C). A 10mL del macerado acuoso se le adicionan 30mL de NaOH 2N y se mantiene a temperatura ambiente, durante 4h. Después se añade HCl concentrado, para acidificar, y se extrae con éter.

Estudio Cromatográfico

A continuación, se procede al estudio cromatográfico de todos los extractos resultantes, con la ayuda de patrones [252].

SOPORTES:

- Silicagel 60 G Merck.
- Celulosa microcristalina sin indicador.

FASES MÓVILES:

- Ácido acético al 1%, 2%, 6% y 15%.
- Benceno:Metanol:Acético (90:16:8)

Las flavonas interfieren en la identificación de los ácidos fenoles, por lo que la fase móvil con la que se obtienen mejores resultados es el ácido acético al 2%, pues deja a las flavonas en el depósito, aunque retiene algo los ácidos fenoles. Por otro lado, la celulosa se comportó como mejor adsorbente que el silicagel, observándose una mayor nitidez en el color de las distintas manchas.

Para la identificación de los ácidos fenoles se siguen dos procedimientos:

1. FLUORESCENCIA AL UV: los ácidos fenoles derivados del cinámico y los derivados del benzoico, con hidroxilo en orto, presentan fluorescencia, más o menos intensa.

2. REVELADO: las placas cromatográficas se revelan siguiendo el método de Swain, con p-nitroanilina diazotada de preparación extemporánea, formada por 2mL de solución de p-nitroanilina al 0,5% (p/v) en HCl 2N, IV gotas de solución de nitrito sódico al 5% y 8mL de solución de acetato sódico al 2% (p/v). Una vez que el cromatograma está seco, se somete a pulverización, con una solución de carbonato sódico al 15%.

Se realizan cromatografías de los patrones y de las 4 fracciones obtenidas: ácidos fenoles combinados (extracto acuoso), ácidos fenoles libres (extracto etéreo), hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina.

PATRONES:

Derivados del Ácido Benzoico

Ácido gentísico
Ácido p-hidroxibenzoico
Ácido protocatéquico
Ácido isovainílico
Ácido elágico
Ácido siríngico

Derivados del Ácido Cinámico

Ácido cinámico
Ácido p-cumárico
Ácido cafeico
Ácido ferúlico
Ácido clorogénico

Resultado: El estudio cromatográfico pone de manifiesto la presencia de los siguientes ácidos fenoles, en forma combinada: isovainílico, siríngico y p-hidroxibenzoico; y en forma libre: isovainílico y p-hidroxibenzoico.

TANINOS

En 1796 se empleó, por primera vez, el término *Tanino*, para designar a aquellos compuestos de composición compleja, presentes en extractos vegetales. Constituyen una mezcla de polifenoles difícilmente separables, caracterizados por su capacidad de formar con las proteínas de la piel animal combinaciones imputrescibles y poco permeables, convirtiéndola así en cuero. También son caracterizables por las coloraciones azules, negras y verdes que se obtienen con las sales de hierro. La importancia histórica de los taninos es debida a su uso como curtientes; el curtido consiste en la formación de enlaces entre las fibras de colágeno de la piel, obteniéndose una notable resistencia al agua, al calor y a la abrasión. Los enlaces formados suelen ser puentes de hidrógeno, así como enlaces covalentes y oxidación a quinonas en el colágeno, asegurándose una mayor estabilidad. La combinación de los taninos con las macromoléculas explica el hecho de que precipiten la celulosa o las pectinas, así como las propiedades astringentes que confieren a las drogas ricas en estos compuestos, pues al precipitar las glucoproteínas salivares, hacen que la saliva pierda su poder lubricante.

Los taninos se definen como compuestos fenólicos hidrosolubles, cuyo peso molecular ha de estar comprendido entre 500-3000 daltons; si es mayor, la molécula de tanino no podría intercalarse entre los espacios interfibrilares de las macromoléculas; y si el peso molecular es muy bajo, el tanino no podría formar una combinación estable, pues no se daría un número suficiente de enlaces, denominándose en este caso, pseudotaninos, los cuales, en determinadas condiciones, podrían dar precipitados con la gelatina y otras proteínas. Se solubilizan también, en alcohol y acetona, siendo prácticamente insolubles en éter y cloroformo [234,252].

En base a su estructura y origen biogénico, pueden clasificarse en dos grupos:

- * Taninos hidrolizables o pirogálicos
- * Taninos condensados o catéquicos

Taninos Hidrolizables

Pueden ser hidrolizados por ácidos o enzimas, como la tanasa. Están formados por varias moléculas de ácidos fenólicos como el gálico y el elágico, siendo más frecuentes los taninos elágicos. Los taninos gálicos están constituidos por un núcleo central de glucosa y una cadena lateral de varios ácidos gálicos. Sus soluciones toman color azul con sales de hierro, al igual que el ácido gálico. Estos taninos se conocen como pirogálicos debido a que por destilación seca, el ácido gálico y similares se convierten en pirogalo. El ácido elágico es el dépsido del ácido gálico, y, normalmente, se encuentra como diéster de su forma abierta o ácido hexahidroxidifénico (Figura 36).

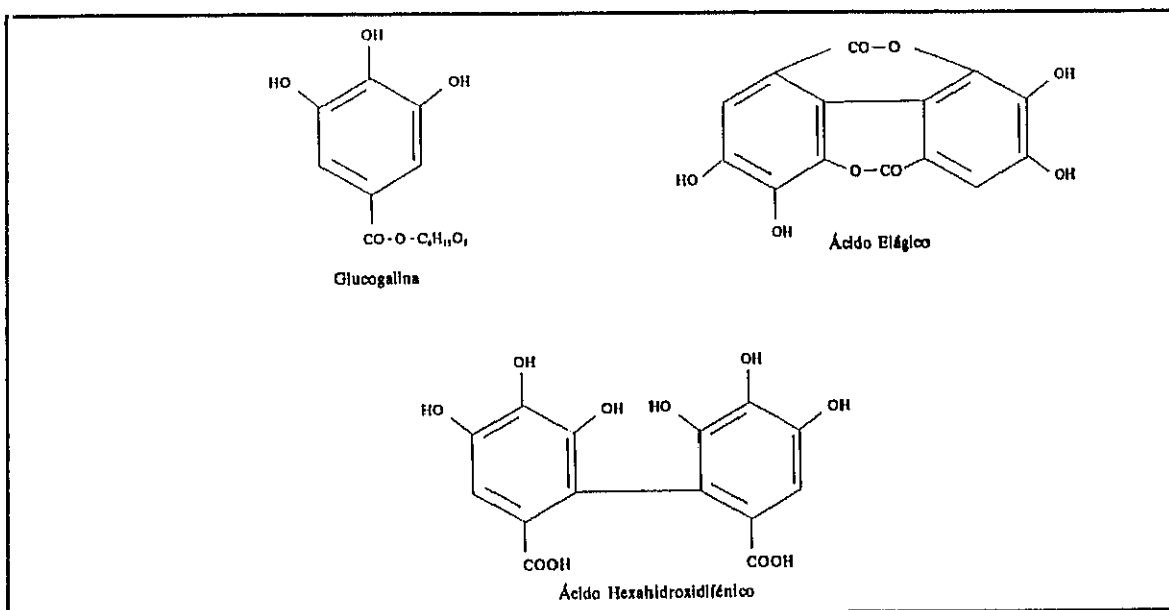


Figura 36.

Taninos Condensados

También conocidos como proantocianidoles o proantocianidinas. Aunque no está perfectamente establecido, la polimerización de 3,4-flavandioles podría dar lugar a los taninos condensados, siendo posible que dichos compuestos y las catequinas sean intermediarios en su biosíntesis.

Son más resistentes que los taninos pirogálicos, pero pueden ser descompuestos por tratamiento con ácidos o enzimas, dando lugar a los llamados flobáfenos, polímeros de peso molecular muy elevado e insolubles. Los flobáfenos confieren una coloración roja característica a muchas drogas, como la corteza de quina roja. Sometidos a destilación seca dan lugar al catecol, que toma color verde oscuro con cloruro férrico, al igual que las soluciones de este grupo de taninos.

Propiedades Físico-Químicas de Taninos

Los taninos son solubles en agua, en forma de soluciones coloidales, variando su solubilidad en función del grado de polimerización. También son solubilizados por álcalis diluidos, alcohol, glicerina y acetona, y sólo

ligeramente solubles en otros disolventes orgánicos. Las soluciones precipitan con sales de metales pesados, alcaloides, heterósidos, gelatina, albúmina, molibdato amónico. Como todos los derivados fenólicos, reaccionan con sales férricas (Cl_3Fe), los hidrolizables dan precipitados de color azul oscuro y los condensados, verde parduzco.

Caracterización

La valoración de taninos se hace complicada, por la dificultad de la total extracción de este grupo de principios. Generalmente, se recurre a un ensayo de tanificación y se determinan cuantitativamente por su absorción sobre un polvo de piel standard (goldbeater's skin), aprovechando su capacidad de precipitar las proteínas. Otro método específico, se basa en su capacidad de aglutinar hematíes, por lo que a una solución de tanino se le adiciona una dilución sanguínea, el complejo tanino-hematíes se filtra y la hemoglobina residual se determina por colorimetría.

Los ensayos cualitativos más usuales se llevan a cabo sobre el extracto acuoso de la sumidad florida de la planta [88,375].

Se prepara una infusión al 10% de la droga pulverizada, se separa el marco por filtración, y con el líquido resultante de la filtración se realizan los siguientes ensayos [88,252]:

* *Sabor*: astringente.

* *Ensayo con solución de Cl_3Fe al 5%*: se toma una alícuota del filtrado y se añaden unas gotas del reactivo. Este ensayo también podría utilizar, como reactivo, una solución de sulfato férrico amónico al 10%. En ambos casos, se obtendrá un precipitado verde oscuro, para taninos catéquicos, y azul si son del tipo pirogálicos.

* *Reacción de Stiasny*: A un volumen de 30mL del extracto acuoso se le adiciona igual cantidad del reactivo (formol al 30% y HCl concentrado, en proporción 2:1). Se lleva a baño maría, provisto de refrigerante de reflujo,

durante 30 minutos. Stiasny es específico de taninos catéquicos, que precipitan en forma de masas algodonosas marrón-rosado, llamadas, como ya se ha indicado, flobáfenos; al contrario de los taninos gálicos, que permanecen en solución. Se filtra, y sobre el filtrado se añade un exceso de acetato sódico al 20%, para neutralizar el ácido (debe ser comprobado con papel indicador); posteriormente, se realiza un ensayo con Cl_3Fe al 5%, obteniéndose un precipitado azul, en caso de existir taninos gálicos. Stiasny precipita taninos catéquicos y catequinas, quedando en solución los pirogálicos.

* *Ensayo con dicromato potásico al 5%*: al añadir unas gotas del reactivo al líquido extractivo, deberá aparecer coloración marrón parduzca, debido a la oxidación de los taninos. No es una reacción específica de taninos, pero sí orientativa.

* *Reacción de precipitación con antipirina [115,375]*: a una alícuota de 10mL del extracto acuoso del material vegetal se le añade el mismo volumen del reactivo: antipirina 10g / citrato sódico 10g / agua destilada c.s.p. 100g. Con los taninos gálicos aparece un precipitado, se separa por filtración, y al filtrado se le añade Cl_3Fe al 5%, apareciendo coloración verde si existen taninos catéquicos en solución.

* *Reacción con sulfuro amónico*: se agregan II ó III gotas de ácido sulfúrico concentrado, a unos 20mL del filtrado; se lleva a ebullición, durante 2 minutos. Se añaden 5g de ClNa y se deja reposar durante 10 minutos. Posteriormente se filtra, y a unos mililitros del filtrado se adicionan 15mL de agua y X-XV gotas de sulfuro amónico al 5%. Mediante este ensayo se observa precipitación de los taninos gálicos, los catéquicos no precipitan.

* *Reactivo de Carpeni-Sysley [375]*: consiste en una mezcla de 2.7g de acetato de zinc, 8g de NH_3 concentrado y agua destilada en c.s.p. 100mL. Se adicionan 2mL del reactivo a 5mL del extracto acuoso de la planta. En caso de existir taninos, éstos precipitarían.

Resultado: Los ensayos realizados permiten poner de manifiesto la existencia de compuestos fenólicos, pero no puede asegurarse en el caso de taninos, ya que las pruebas específicas de los mismos fueron negativas.

CUMARINAS Y SUS HETERÓSIDOS

La *Cumarina* fue aislada, en 1820, del haba tonca o 'coumarou' (*Dypteryx odorata* Willd), de donde toman su nombre estos compuestos. Se aceptan a los ácidos fenoles como sus precursores biológicos, puesto que las cumarinas son las lactonas de los ácidos fenoles orto-hidroxilados (o-hidroxicinámicos). Los derivados de la benzo- α -pirona, como la cumarina, esculetina, umbeliferona y escopoletina (Figura 37) son comunes en los vegetales, en forma libre o heterosídica, compuestos sólidos e incoloros, de olor característico, que recuerda al heno recién cortado.

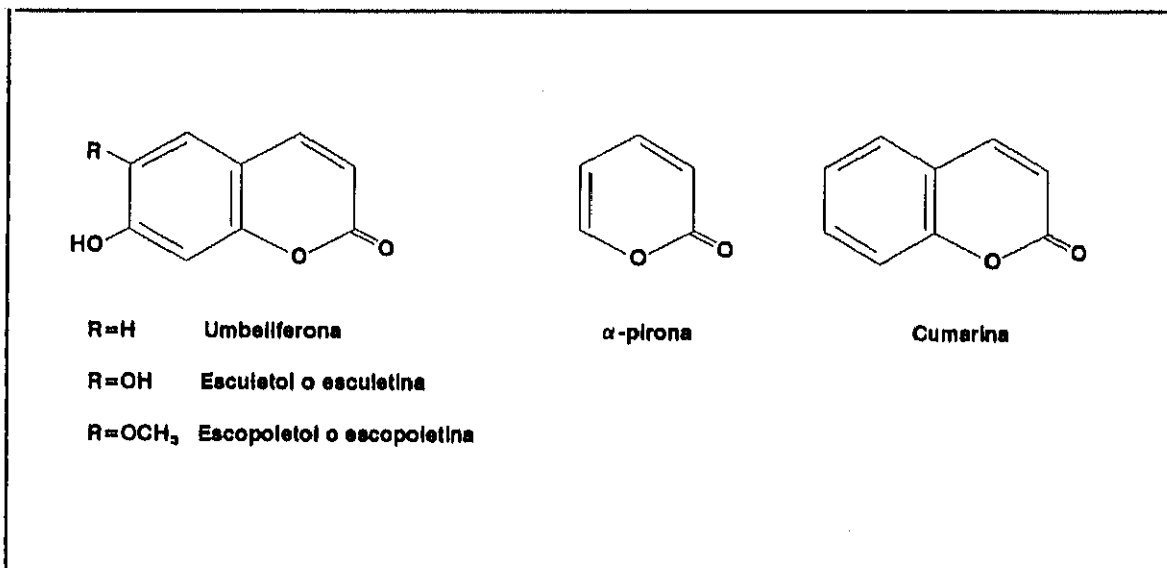


Figura 37.

Las cumarinas son solubles en alcohol, en estado libre, y en agua en forma heterosídica. En medio alcalino, la lactona se abre permitiendo la solubilización, estas soluciones se colorean de amarillo; posteriormente, se cicla en medio ácido, y desaparece el color al regenerarse la lactona, aprovechando estas propiedades para su purificación.

Este grupo de compuestos muestra un espectro UV típico, que varía en base a las sustituciones presentes, presentando fluorescencia azul, azul-verde o violeta, exaltada en solución alcalina, que se emplea como ensayo cualitativo.

Las cumarinas volátiles son fácilmente detectables usando como reactivo NaOH al 5%. En un matraz Erlenmeyer se introducen 2g de droga pulverizada y se humecta con agua ácida. El matraz se cubre con un papel de filtro, previamente humedecido con la solución de NaOH al 5%. A continuación, se calienta a baño maría hirviente, durante 15 minutos y se observa el papel de filtro que cubría el matraz, a la luz UV. Si la reacción es positiva aparecerá una fluorescencia amarillo-verdosa, verde en el caso de furanocumarinas.

Resultado: Negativo.

ANTRAQUINONAS Y SUS HETERÓSIDOS

Constituyen uno de los grupos de quinonas naturales, caracterizados por la presencia de compuestos fenólicos, más o menos oxidados (antraquinonas, antronas y antranoles), relacionados con el antraceno, siendo la antraquinona, la quinona del antraceno en posición 9 y 10. La antraquinona, por reducción suave, origina los antranoles, que se hallan en equilibrio tautómero con las antronas; y a través de una reducción más fuerte de la antraquinona, se obtienen las antrahidroquinonas y sus formas tautoméricas, las oxantronas. Las antronas y antranoles se designan con el término de formas reducidas, y en condiciones oxidantes especiales, las

antronas pueden combinarse como diantronas. Las formas oxidadas son las antraquinonas [375].

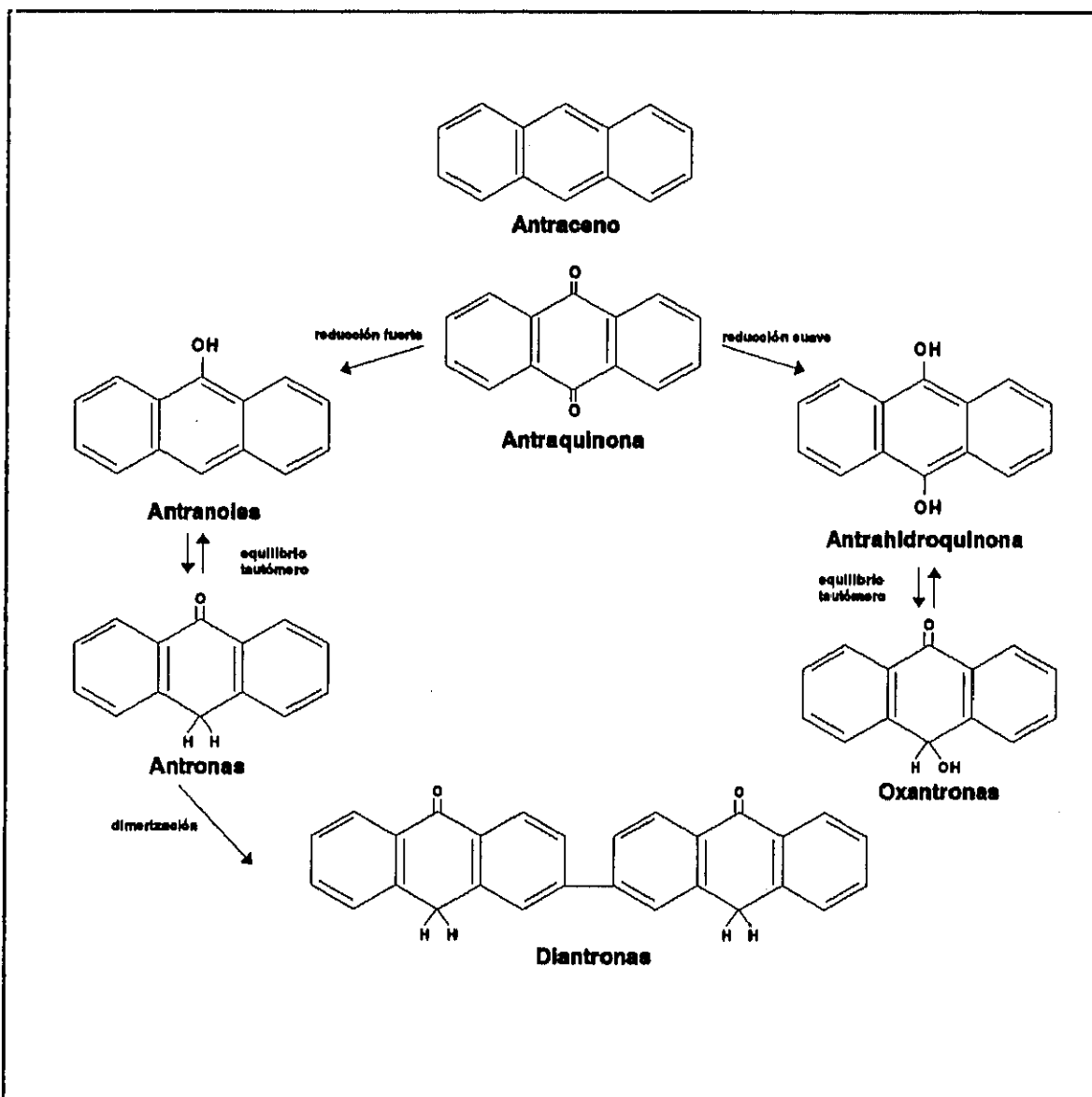


Figura 38.

Estos principios se encuentran en los vegetales en estado libre o constituyendo el aglucón de diversos heterósidos. Debido a la inestabilidad de antronas y antranoles, las geninas libres son siempre antraquinonas y las formas reducidas sólo se encuentran como heterósidos, pudiendo unirse el azúcar en diversas posiciones, incluso formando C-heterósidos (aloínas) y O-heterósidos de C-glucósidos (cascarósidos).

Los heterósidos antraquinónicos pueden ser di, tri o tetrahidroxifenoles, y presentar otros grupos sustituyentes, como metilo, hidroximetilo, carbonilo. Las osas suelen ser ramnosa y glucosa, pudiendo estar la genina unida, simultáneamente, a una glucosa en 8 y a una ramnosa en 6, formando así un biósido o heterósido primario, llamado así porque la glucosa se pierde durante la desecación.

Estos compuestos poseen una marcada actividad fisiológica, que según la dosis administrada ejercerán una acción colagoga, laxante o purgante, más o menos violenta.

Las geninas libres (antraquinonas) son prácticamente inactivas y los heterósidos, β -glucósidos hidrosolubles, se hidrolizan a nivel de colon, a través de las β -glucosidasas de la flora intestinal; las antraquinonas se reducen, y por tanto, las formas reducidas creadas, *in situ*, serían las activas.

Los heterósidos son solubles en agua y soluciones hidroalcohólicas, y las geninas en agua alcalina, dando reacciones de coloración rojiza, rosada o violeta, y en disolventes orgánicos, en medio ácido. En el caso de estar formando heterósidos, han de liberarse las geninas, mediante hidrólisis ácida, para después verificar las reacciones con el álcali. Los O-heterósidos se hidrolizan en medio ácido; los C-heterósidos en presencia de Cl_3Fe , y las diantronas se transforman en antraquinonas usando el mismo reactivo, pero en medio neutro.

Los principios antraquinónicos pueden extraerse por maceración de la droga en solución acuosa alcalina. Para su identificación se usa la *Reacción de Bornträger*, que se fundamenta en la propiedad que poseen las geninas, en su forma más oxidada, de dar color rojo a sus soluciones, en contacto con

álcalis, provocándose un viraje de coloración amarillo-naranja a rojo cereza característico, debido a la ionización de los hidroxilos fenólicos, lo que ocasiona una mayor resonancia molecular. Por tanto, esta reacción es positiva, únicamente, para las formas antraquinónicas libres. Como ya se ha indicado, para reconocer con este ensayo los heterósidos, se someten a hidrólisis, y las antronas y antranoles deben oxidarse a formas quinónicas.

Antraquinonas Libres

Se extraen, por ebullición, unos 3g de planta con 50mL de agua, a la que se añaden unas gotas de NaOH al 10%. Filtrar y dejar enfriar. Si existen antraquinonas en solución, ésta tomaría un color rojo-cereza. Se confirma el resultado mediante la Reacción de Bornträger, que consiste en acidificar el líquido extractivo con HCl al 10%, y después agitar con éter sulfúrico. Las antraquinonas pasan de la fase acuosa a la orgánica. A continuación, se separa la capa etérea y se añade una solución acuosa de KOH al 5% o NH_3 al 10%. Si la capa acuosa toma un color rojo y la etérea se decolora, la reacción es positiva.

En caso de que el resultado no sea muy claro, puede procederse a realizar otras extracciones cambiando de disolventes:

- Extracción con benceno: 3g de muestra se agitan con 15mL de benceno, y se deja en contacto unas horas, agitando de vez en cuando. La solución bencénica se agita con amoníaco diluido, y en caso de positividad tomará un color rojo.

- Extracción con cloroformo: se agota el polvo de planta por agitación con cloroformo, se filtra y al líquido filtrado se añade KOH, extrayendo tres veces en ampolla de decantación. La solución acuosa se acidula con HCl al 10%, y se vuelve a extraer con cloroformo. Nuevamente se adiciona KOH al líquido clorofórmico, que adquirirá una tonalidad rojiza en presencia de antraquinonas.

Se puede realizar una prueba sobre papel de filtro, en el que se depositan unas gotas de la solución clorofórmica y se tratan seguidamente con NH_3 .

Resultado: A la vista de los resultados negativos obtenidos, puede afirmarse la ausencia de antraquinonas en la droga a estudio.

Antraquinonas Combinadas

Los marcos resultantes de las anteriores extracciones se hidrolizan, con H_2SO_4 diluido al 1/10, mediante ebullición a reflujo durante 4 horas.

Después de la hidrólisis, se realizan las mismas pruebas que para el estudio de antraquinonas en forma libre.

Resultado: También en este caso, el resultado es negativo, con lo que puede afirmarse que la especie *Teucrium buxifolium* carece de derivados antracénicos.

FLAVONAS Y HETERÓSIDOS FLAVÓNICOS

Los compuestos flavónicos son derivados polifenólicos, que provienen de la hidroxilación en el anillo de la benzo y pirona. Constituyen, al tiempo que las xantonas y antocianos, los principales pigmentos naturales del Reino Vegetal. Las flavonas, sus heterósidos y flavonoides relacionados, suelen ser amarillos, del latín *flavus*=amarillo. Pueden ser también responsables de coloraciones malvas, azules y anaranjadas, que favorecen el proceso de polinización [127]. Son compuestos hidrosolubles, que aparecen en tejidos jóvenes [252], generalmente en forma de O-heterósidos y en ocasiones, como C y di-C-glicosilflavonoides.

La mayor parte de los heterósidos son solubles en agua, alcohol, ácidos y álcalis, aunque algunos tienen una solubilidad poco marcada en agua (rutósido, hesperidósido). Mientras que los heterósidos son insolubles en benceno, cloroformo y éter, las geninas son solubles en disolventes orgánicos apolares, y por poseer carácter fenólico, se solubilizan en soluciones acuosas de hidróxidos alcalinos. En medio alcalino, las flavonas y sus derivados intensifican la coloración amarilla. Como derivados fenólicos, $C_6-C_3-C_6$ [235], son capaces de formar, por quelación, complejos con los metales (Fe y Al, principalmente), propiedad utilizada para el reconocimiento de estas sustancias, revelado de cromatogramas, valoración y realización de espectros de absorción. Probablemente se deba su poder como antioxidantes a esta misma propiedad quelante.

Los flavonoides presentan un marcado interés farmacológico por sus propiedades vitamínicas P, disminuyendo la fragilidad capilar. Drogas ricas en flavonoides han demostrado su potencial terapéutico como diuréticos, coleréticos, hipotensores antihemorrágicos [311], antiespasmódicos y estrógenos. Además, actúan sobre la cascada del ácido araquidónico, lo que podría justificar su actividad antiagregante plaquetaria [361], antiinflamatoria [6,150,227,357,358,359,360,363,367] y muchos son antiulcógenos [196,249,359,360]. Algunos flavonoides parecen combatir ciertos tipos de cáncer [234,291].

Para la determinación de estos principios se extrae la planta con agua, calentando a fuego directo. Se filtra, y en alícuotas del filtrado se realizan los ensayos cualitativos. Otros autores aconsejan una extracción metanólica, a reflujo, durante 1h; se filtra y concentra, recogiendo el residuo metanólico en agua hirviente y agitando vigorosamente para, a continuación, filtrar en caliente, y sobre el líquido acuoso verificar las reacciones cualitativas de caracterización [88,375]:

* *Reacción de coloración con álcalis:* como reactivo alcalino se usa la KOH alcohólica al 5%. Unas gotas de potasa se adicionan sobre unos 5 mL del extracto preparado; el álcali reacciona con los grupos fenólicos de los flavonoides, formando fenatos. Esto provoca una intensificación del color de la solución acuosa.

* *Reacción de coloración con Cl_3Fe al 3%*: cuando los flavonoides tienen grupos fenólicos en posición orto, este reactivo da una coloración verde oscura. Con el resto de los flavonoides, aparecerá un color oscuro, más o menos verde.

* *Reacción de la cianidina o test de Shinoda*: es el ensayo más importante dentro de los citados, porque también es válido para la valoración colorimétrica de estos compuestos. Esta reacción se basa en que los flavonoides, en presencia de hidrógeno nascente, producido por la acción del HCl sobre polvo de zinc o magnesio, son reducidos a antocianidinas, ocasionando la aparición de coloraciones que van desde el rojo-naranja o cereza, al violeta.

A 2mL del líquido acuoso de la planta, se le adicionan 2mL de alcohol de 96°, y se trata con una mínima cantidad de Mg en polvo (punta de la espátula), y HCl concentrado.

La coloración obtenida es distinta dependiendo del tipo de flavonoide:

flavonas → naranja
flavonoles → rojo-cereza
flavanonas → rojo-violeta

Ocasionalmente, flavonoles, flavonas y flavanonoles dan colores verdes o azules. La reacción es negativa para isoflavonoides y chalconas.

* *Reacción de Constantinescu*: este ensayo utiliza como reactivo $AlCl_3$ al 2% en alcohol. Todos los flavonoides, por su naturaleza polifenólica, son capaces de formar complejos con metales, como el aluminio, provocándose una fluorescencia al ultravioleta que recorre la gama del amarillo al naranja. Los flavonoles e isoflavonas muestran fluorescencia amarilla, verde si se trata de flavanonas o auronas, y naranja para las chalconas.

Este ensayo se puede practicar como reacción de toque sobre papel. En una tira de papel de filtro se depositan, por medio de un capilar de vidrio, unas gotas del extracto acuoso de la droga. Una vez seco el papel, se

pulveriza con AlCl_3 , se calienta a 110°C , durante 5 minutos y se observa al UV, a una longitud de onda de 360nm [232].

Resultado: En todos los ensayos cualitativos citados se ha obtenido un resultado positivo, con lo que puede considerarse que la especie objeto de estudio posee heterósidos flavónicos, fundamentalmente del grupo de las flavonas, hecho que concuerda con la bibliografía encontrada al respecto.

ANTOCIANIDINAS, ANTOCIANINAS Y LEUCOANTOCIANOS

Derivados Antociánicos

Pueden presentarse como heterósidos, antocianos o antocianinas, o bien en forma libre, antocianidoles o antocianidinas, tomando estos nombres del griego *antho*, flor y *kyanos*, azul. Constituyen un grupo de pigmentos vegetales hidrosolubles, de estructura intermedia entre los catecoles y los flavonoides; estructuralmente relacionados con las flavonas, son derivados del núcleo flavilio (2-fenilbenzopirilio) (Figura 39). Confieren tonalidades roja, rosa, azul o violeta, a las flores y frutos, y en ocasiones colorean también las hojas. El color del órgano de la planta es determinado por el pH de la savia en que son contenidos estos pigmentos. Se utilizan en la industria farmacéutica y alimentaria, como tales colorantes, sin olvidar por ello su actividad biológica sobre la resistencia capilar [232,373].

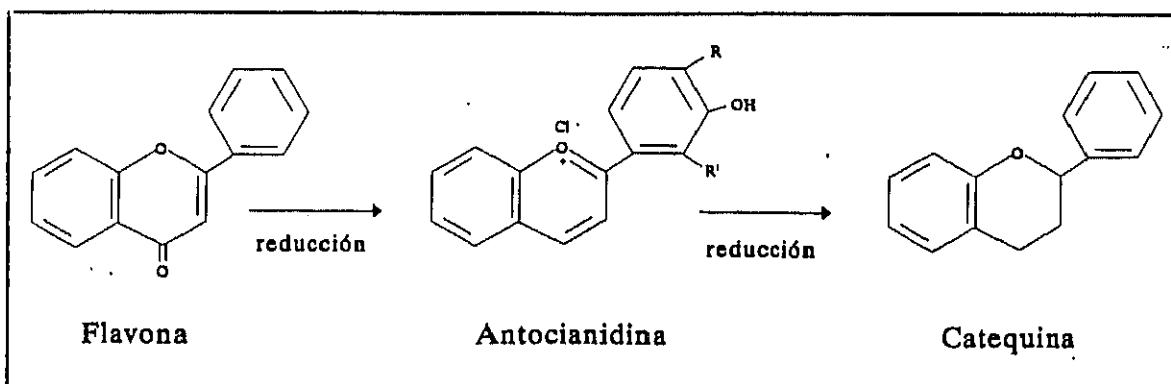


Figura 39.

Los antocianos pueden presentar estructuras de monósidos, uniéndose el glúcido al hidroxilo en posición 3, o biósidos, uniéndose en 3 y 5 los restos osídicos, que en cualquier caso, pueden ser mono, di o trisacarídicos; es frecuente que los biósidos posean alguna acilación.

Las antocianidinas, generalmente presentan una carga positiva deslocalizada, que se representa como oxonio, sobre el átomo de oxígeno intracíclico del núcleo piránico.

Los antocianos son solubles en agua y alcoholes, pero inmiscibles con disolventes orgánicos apolares. Pueden extraerse en alcohol, ligeramente acidificado. Las geninas son poco solubles en agua, inestables en solución, sobre todo en medio alcalino. Dicha inestabilidad se manifiesta por los cambios de coloración de las soluciones, en función del pH. Estos cambios son debidos a la formación de un carbinol que, por aumento del pH, se degrada a una chalcona, prosiguiendo, de forma irreversible, la degradación, en caso de encontrarse el hidroxilo en posición 3, sin sustituir.

Su investigación se basa en los citados cambios de coloración, según el pH, presentando color rojo en medio ácido, que vira a azul, a pH alcalino.

A un volumen de unos 10mL del extracto acuoso, se le adiciona ácido clorhídrico en frío, el viraje a rojo-naranja es característico de los

antocianos. A continuación, se puede ir añadiendo NH_3 ó NaOH , hasta que dé reacción alcalina, y la solución vire a azul.

Resultado: No se obtiene coloración rojiza en medio ácido, ni existe viraje hacia tonalidades azules al aumentar el pH, por lo que se deduce que no existen derivados antociánicos en *Teucrium buxifolium*.

Leucoantocianos

Los leucoantocianos son sustancias naturales que juegan un papel importante en la constitución de los taninos. Se transforman en sus antocianos homólogos al adicionar ácidos minerales en caliente, produciéndose coloraciones rojas o rojo-violáceas [252,373].

Se toman 10mL del extracto acuoso del polvo seco de la planta, y se añade un volumen igual de la mezcla (etanol de 96° : ácido clorhídrico concentrado) en proporción 1:1 (v/v), agitando a menudo, para conseguir un buen contacto con el aire y asegurar así la oxidación.

Resultado: Al no manifestarse la coloración roja, propia de los antocianos en medio ácido, puede afirmarse que no se dan leucoantocianos en la planta objeto de estudio.

SAPONINAS

Los saponósidos son heterósidos cuya genina puede ser de naturaleza esteroídica (saponinas neutras o sapotoxinas, derivadas de un anillo esteroídico, el ciclopentanoperhidrofenantreno) o triterpénica (saponinas ácidas).

Presentan, como característica común más destacada, la formación con el agua de falsas soluciones, dando, por agitación, una espuma persistente (del latín *sapo*=jabón). Son compuestos frecuentes en los vegetales, excepcionales en los animales (Equinodermos). Las sapogeninas esteroideas son más comunes en Monocotiledóneas, mientras que las triterpénicas aparecen ampliamente distribuidas en las Dicotiledóneas.

Las saponinas esteroideas cristalizan, y son de gran interés por su relación con hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D y heterósidos cardiotónicos. Las de naturaleza triterpénica son amorfas, poco o nada tóxicas y están contenidas, frecuentemente, en cantidades considerables en las plantas, por ejemplo, la corteza de Quilaya posee hasta un 10% de la mezcla conocida como 'saponina comercial'. Es interesante el hecho de que a lo largo del ciclo biológico del vegetal, la proporción en estos compuestos es variable, con lo que la actividad de la droga aumenta o disminuye sensiblemente.

Las propiedades farmacológicas son variadas y se deben, fundamentalmente a los saponósidos triterpénicos. Algunos saponósidos son antiinflamatorios, como la glicirricina del rizoma de regaliz, o la escina del fruto del Castaño de Indias, las saikasaponinas del *Bupleurum falcatum* (medicina popular china), fitolacósido B de las raíces de *Phytolacca americana*... Por otro lado, la tradición atribuye propiedades expectorantes y antitusivas, a diversas drogas con saponinas: hiedra y polígala, *Platycodon grandiflorum*; así como propiedades antihemorroidales, cicatrizantes... Poseen propiedades hemolíticas, atribuidas a su interacción con el colesterol de la membrana eritrocitaria, tóxicos para los animales de sangre fría, especialmente para los peces; con respecto a los mamíferos, por vía oral las saponinas son prácticamente inactivas, aumentando la

toxicidad, de forma considerable, por vía parenteral. Es de destacar el hecho de que una planta que contenga sustancias hemolíticas, no prueba que posea saponinas, y de las especies hemolíticas examinadas, tan sólo el 50%, más o menos, contienen saponinas.

Los heterósidos son solubles en agua e insolubles en disolventes apolares. Se extraen con alcoholes o soluciones hidroalcohólicas. Bajo la acción hidrolizante de ciertas enzimas específicas o de los ácidos minerales [234], las saponinas se desdoblan, siendo las sapogeninas insolubles en agua y carbonatos alcalinos, y solubles en alcohol, acetona, ácido acético, éter y cloroformo. Dichas geninas son menos activas que las saponinas de las que derivan.

los azúcares constituyentes de los saponósidos, suelen ser glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa. Las sapogeninas triterpénicas, frecuentemente, presentan ácidos urónicos. Por lo general, la parte azucarada es un oligósido lineal o ramificado, de hasta cinco unidades. La unión del resto osídico implica, preferentemente al hidroxilo en 3 de la genina, y en el caso de los saponósidos triterpénicos, en ocasiones, se produce encadenamiento de varias osas u oligósidos, por intermedio de varios hidroxilos del aglicón.

La presencia de saponinas se determina basándose en sus propiedades físico-químicas y biológicas:

a. Formación de soluciones coloidales con el agua, produciendo espuma persistente, por agitación de sus soluciones acuosas.

b. Pérdida de la capacidad de producción de espuma, tras hidrólisis ácida.

c. Sabor amargo y acre, y las drogas que las contienen, generalmente son estornutatorias e irritantes de mucosas. Las saponinas del regaliz constituyen una excepción, por su dulce sabor.

d. Actividad hemolítica, que desaparece cuando forman productos de adición con soluciones alcohólicas diluidas de lecitinas o colesterol. Estas combinaciones se descomponen por tratamiento con xilol o alcohol etílico o metílico hirviente, reapareciendo el poder hemolítico [83].

e. Son agentes tensoactivos.

f. Dan reacciones de coloración, no específicas, útiles para reconocer su naturaleza esteroídica o triterpénica.

g. También dan positivas las reacciones de coloración de azúcares por su naturaleza heterosídica.

La valoración cuantitativa de saponinas se lleva a cabo por la determinación de dos índices: índice de espuma y poder hemolítico.

Reactivos

* *Lieberman-Bouchard*: formado a partes iguales por el líquido extractivo clorofórmico a investigar y anhídrido acético, añadiéndose III ó IV gotas de H_2SO_4 concentrado.

* *Rosenthaler*: solución de vainillina al 1% en etanol y unas gotas de HCl ó H_2SO_4 concentrado.

* *Molisch*: solución de α -naftol al 5% en etanol, de la cual se adicionan unas gotas al extracto a investigar, añadiéndose a continuación, H_2SO_4 concentrado, lentamente y resbalando por las paredes del tubo de ensayo, para evitar proyecciones.

A partir de la droga pulverizada se realiza una infusión al 10%. Se separan dos alícuotas de la misma, para realizar los ensayos pertinentes.

De una de las alícuotas se toman 3mL y se ponen en un tubo de ensayo y se agitan vigorosamente, durante un minuto. Se deja reposar, durante una hora, y se observa la cantidad y persistencia de la espuma formada.

En otro tubo de ensayo, se añade al líquido extractivo igual cantidad de un disolvente no miscible con el agua, como por ejemplo el cloroformo, y se agita con fuerza, comparándolo con otro tubo en el que el líquido extractivo se sustituye por agua. En el primer tubo se observará que la

emulsión formada no se separa tan fácilmente, en el caso de existir saponinas, debido a su poder emulsificante.

Por tanto, estos dos primeros ensayos, se basan en el poder emulgente y tensoactivo de los saponósidos.

Con otra alícuota se procede a realizar una reacción de oxidación, para lo cual se añade cuidadosamente, y resbalando por las paredes, una solución de dicromato potásico en ácido sulfúrico concentrado (mezcla crómica), de manera que se forman dos capas perfectamente distinguibles en el tubo de ensayo. Se observará la formación de un anillo verde esmeralda en la fase de separación de las dos capas, en caso de positividad, correspondiente a las saponinas que posean en su molécula un anillo esteroídico, el cual ha sufrido un proceso de oxidación.

Se separan otros 3mL de la infusión inicial y se ensaya la presencia de los azúcares, correspondientes a los heterósidos saponínicos; para ello, se utiliza el reactivo de Molisch, y si aparece un anillo rojizo en la interfase que existe entre la capa acuosa y la sulfúrica, esto nos indica la presencia de dichas osas.

Posteriormente, se procede a la diferenciación entre moléculas de naturaleza esteroídica (Reacción de Lieberman-Bouchard) o triterpénica (Reacción de Rosenthaler).

Los líquidos acuosos se someten a una extracción líquido-líquido, con cloroformo, y sobre los líquidos clorofórmicos concentrados, se ensayan las citadas reacciones de coloración-diferenciación:

* *Reacción de Lieberman-Bouchard:* A 3mL del líquido clorofórmico se le añaden 3mL de anhídrido acético. Una vez frío se adicionan, gota a gota, III ó IV gotas de H_2SO_4 conc. La reacción es positiva si la solución vira de violeta a azul, y si se mantiene en oscuridad, pasa a verde, en caso de positividad. Es conveniente realizar este ensayo en una cápsula de porcelana, para observar con mayor nitidez las coloraciones.

* *Reacción de Rosenthaler*: Sobre un extracto acuoso se realiza una hidrólisis ácida, por ebullición a reflujo (con HCl 2N, durante 2-6 horas). Se filtra y se realiza la extracción líquido-líquido, con cloroformo. A un pequeño volumen de los líquidos clorofórmicos, se le añaden unas gotas de una solución reciente de vainillina etanólica al 1%, y unas gotas de HCl concentrado.

La presencia de saponinas triterpénicas se pone de manifiesto originando la aparición de una tonalidad violeta, mientras que las esteroídicas no producirían coloración, o ésta sería verde.

Las coloraciones específicas son:

Saponinas esteroídicas: color verde o ninguno.

Saponinas triterpénicas: color violeta.

Resultados: Se observa la formación de abundante espuma, que persiste durante un período superior a 30 minutos. Por otro lado, el poder emulgente del extracto acuoso de *Teucrium buxifolium*, queda patente al establecer una emulsión muy duradera, con un líquido no miscible con el agua, como es el cloroformo. La reacción de oxidación realizada, arroja un resultado positivo, pues se observa claramente la formación del anillo verde esmeralda, producto de la oxidación de las saponinas.

La reacción de Rosenthaler originó, en nuestro caso, la coloración violeta, propia de saponinas de naturaleza triterpénica. La presencia de anillos esteroídicos queda confirmada gracias a la positividad obtenida en la Reacción de Lieberman-Bouchard, reacción que también se utiliza rutinariamente para detectar la presencia de esteroides.

RESINAS

Las resinas son mezclas complejas de cuerpos heterogéneos, en parte disueltos en la esencia. En su composición se han podido determinar: glúcidos, aceites esenciales no transformados y constituidos, en general, por carburos terpénicos, ácidos resinosos, ácidos aromáticos (benzoico, cinámico, benzoiláctico, salicílico, fenólico y cafeico), alcoholes resinosos (resinoles y resinotanoles), ésteres de alcoholes y ácidos aromáticos, y resenos, sustancias químicamente inertes [375].

Se hallan con frecuencia junto a esencias (oleo-resinas), gomas (gomo-resinas) o con esencia y gomas (oleo-gomo-resinas).

Estas sustancias, generalmente, exudan de forma natural o a causa de traumatismos, por irritaciones, incisiones. Se forman, generalmente, en canales lisígenos o esquizógenos, como resultado de la actividad protoplásmica.

Pueden presentarse como líquidos, semifluidos, productos siruposos o bien masas consistentes, duras o quebradizas. Por calentamiento, se ablandan e incluso funden. Totalmente indispersables en el agua, solubles en alcohol frío, -aunque en ocasiones se exige hirviente-, éter sulfúrico, sulfuro de carbono, cloroformo, álcalis y ácidos minerales.

La extracción se puede realizar a partir del polvo de la droga, con ayuda de alcohol hirviendo, y se puede purificar con agua a ebullición.

Tienen la propiedad de dar reacciones de coloración verde con sales de cobre. Uno de los ensayos característicos de las resinas con ácidos resínicos, es el de *Unverdorben-Franchimont* [148], en el que la reacción de una solución acuosa de acetato de cobre al 10% con las resinas, provoca una tonalidad verde-esmeralda.

Se colocan, aproximadamente, 2g de droga pulverizada en tubos de ensayo con 10mL de etanol, y se calienta a baño maría, hasta ebullición del alcohol y el líquido extractivo se separa del marco por filtración; posteriormente se evapora a sequedad y se añade 1mL de agua destilada

caliente, en la cual se disuelven algunas impurezas, como taninos y azúcares, pero no las resinas, que son separadas por filtración y recogidas sobre etanol. Sobre esta solución se ensaya el reactivo de Unverdorben-Franchimont.

Resultado: La solución alcohólica de *Teucrium buxifolium* toma una coloración verde-esmeralda en presencia del reactivo citado, que demuestra la existencia de restos resínicos en el material vegetal objeto de estudio.

LACTONAS

Son compuestos procedentes de la esterificación interna de hidroxiácidos, fenólicos o alcohólicos, con pérdida de una molécula de agua (Figura 40) [83].

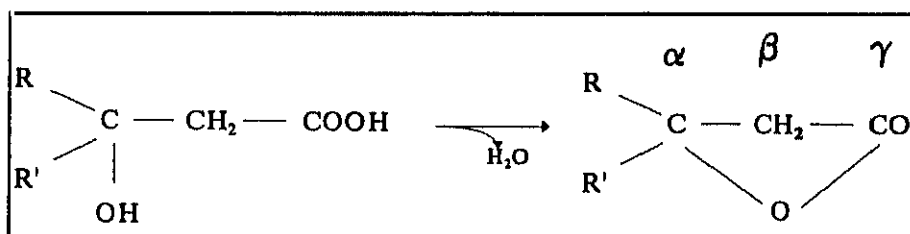


Figura 40. Formación de una lactona

En la naturaleza suelen encontrarse γ y δ -lactonas. Forman parte de muy variadas estructuras con actividad farmacológica acusada: cumarinas, heterósidos cardiotónicos de digitales, sesquiterpenos, antibióticos producidos por el género *Streptomices*,...

En principio, eran consideradas sustancias o productos simplemente amargos. Sus características químicas son muy particulares, debido a su estabilidad, que depende del pH, lo cual supone una ventaja en su reconocimiento, pero un inconveniente en su manejo: estables a pH neutro (7 ó inferior) y muy inestables a pH básico. En solución alcalina se rompen

y dan la sal del ácido hidroxilado, o algún isómero; por acidificación del medio se regenera el anillo o alguno de sus isómeros (Figura 41).

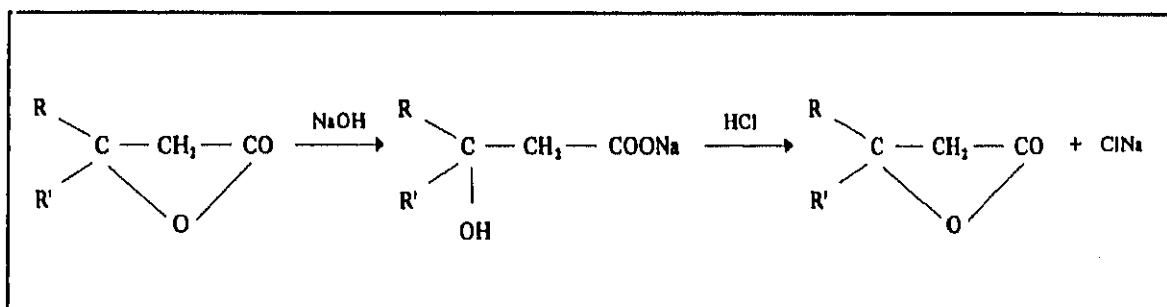


Figura 41. Ruptura de la lactona en medio alcalino y regeneración en medio ácido

Todos aquellos compuestos que posean un grupo lactónico darán positivas las reacciones típicas de lactonas, pudiendo diferenciarse entre ellas por reacciones específicas para el resto de la molécula, del cual dependerá la solubilidad de las lactonas, poseyendo éstas, un amplio intervalo de solubilidades en agua y éter de petróleo.

En un tubo de ensayo de 40mL se ponen 2g de droga en 20mL de cloroformo, y se calienta suavemente, durante 15 minutos, a baño maría, agitando continuamente. Luego se enfría y se separa el líquido extractivo del marco, por filtración, y se divide en 3 alícuotas, sobre las que se ensayan los siguientes reactivos:

* *Baljet*: A 2mL de solución se añade 1mL del reactivo (solución de ácido pícrico al 1%, en alcohol de 50°). Después se adicionan unas gotas de potasa alcohólica al 10% (p/v). El líquido extractivo toma color anaranjado o rojo oscuro, si existen lactonas.

* *Hidroxilamina*: se añade a unos mililitros del líquido extractivo, el mismo volumen de clorhidrato de hidroxilamina, así como de KOH, ambos en solución metanólica 2N. Seguidamente, se calienta en mechero, 1-2 minutos y se enfría; posteriormente, se acidula con HCl 0.5N y se añade una gota de FeCl₃ al 1%. La aparición de una coloración violeta es reacción positiva.

* *Legal* [83]: para ensayar este reactivo, se le añade al extracto líquido unas gotas de piridina, posteriormente se agrega una gota de

nitropursiato sódico al 0.5% y por último, IV gotas de KOH 2N. En caso de aparecer un color rosáceo, la reacción es positiva.

La presencia de lactonas sesquiterpénicas puede ponerse de manifiesto por medio de ensayos en TLC, empleando como reactivo revelador una solución de cloruro de aluminio al 5% en etanol [365].

Resultado: No se obtiene reacción positiva con los reactivos de Baljet y Legal, pero sí aparece la coloración violeta-anaranjada con la reacción de la hidroxilamina.

HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS

Hasta hace poco ha prevalecido la opinión de Vulpian, que afirmaba que un cardiotónico es aquella sustancia capaz de detener el corazón en sístole, según había comprobado en batracios. Pero esta propiedad, en realidad es tóxica y ocurriría sólo a altas dosis. No es, evidentemente, su uso terapéutico. En el hombre se vería, con posterioridad, que se detenía el corazón, tras un período de fibrilación.

El primer uso terapéutico que se hizo de una planta rica en estos compuestos, fue la digital, y no en relación con sus propiedades cardiotónicas directamente, sino para el tratamiento de una hidropesía, en 1785, por Withering, sin saber que ésta era el resultado de una alteración cardíaca.

Los principios cardiotónicos mejoran la circulación sanguínea, por incrementar la potencia cardíaca, mediante un efecto inótropo positivo (contracturante), no llevando aparejado un incremento en el consumo de oxígeno. El empleo de estas sustancias es útil sólo en deficiencias cardíacas crónicas, por lo que se elige en la terapia de ICC (Insuficiencia Cardíaca Congestiva).

Por otro lado, también se han usado ampliamente como venenos, impregnando flechas, especies de las familias *Apocinaceae* y *Asclepiadaceae*, en África, y de la familia *Moraceae*, en Malasia e Indochina.

La distribución botánica de estos principios es restringida a unas pocas familias, y en los animales se presentan de forma excepcional en sapos (bufo). Curiosamente, en el caso del género *Teucrium*, ha sido puesta de manifiesto su presencia en una de sus especies, *T. oliverianum* [146].

Aparecen en la naturaleza en forma de heterósidos, y todas la geninas poseen en común el esqueleto tetracíclico normal de los esteroides. Según los trabajos de Jacobs Tschesche Schmidt, una deshidrogenación daría lugar al carburo de Diels o 3-metil-1,2 ciclopentano-perhidrofenantreno, por lo que se dice que derivan de dicha estructura.

Pueden clasificarse en dos grupos (Figura 42):

Cardenólidos: en C17 poseen un anillo lactónico pentagonal.

Bufanólidos: el anillo lactónico en C17 es hexagonal.

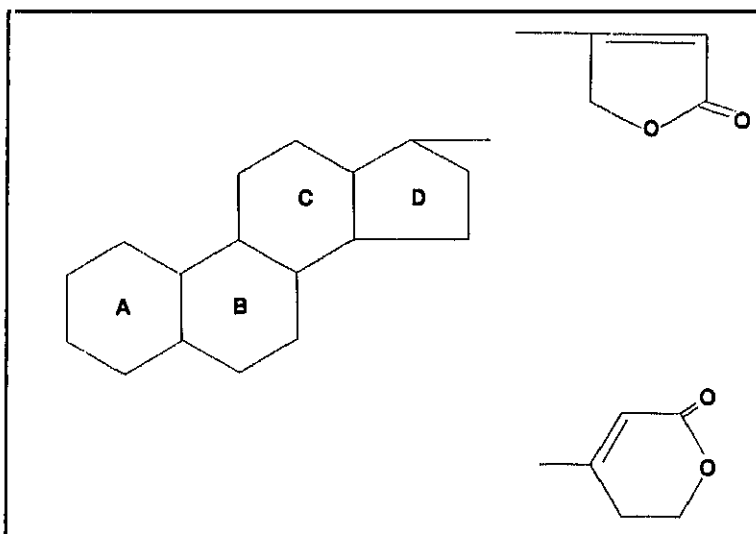


Figura 42. Estructura general de los heterósidos cardiotónicos

En la planta fresca se encuentran, generalmente, heterósidos primarios, que en la planta seca se hidrolizan, en una elevada proporción, en heterósidos secundarios.

Los heterósidos cardiotónicos más usados son los secundarios de *Digitalis purpurea* o *Digitalis lanata* (Familia *Scrofulariaceae*).

Los glúcidos que forman parte de los heterósidos cardiotónicos suelen ser desoxiazúcares y hexosas. La cadena azucarada, unida a la genina a través del C3, puede estar constituida hasta por 3 moléculas de azúcar, glucosa o ramnosa, junto con otros desoxiazúcares, sólo descritos constituyendo este tipo de compuestos.

Suelen ser insolubles en agua, a pesar de los azúcares, sin embargo se extraen con agua, como la cafeína del café, en caliente; además, la droga posee sustancias que favorecen la disolución: saponósidos. Son solubles en cloroformo.

Como operación previa al ensayo cualitativo de heterósidos cardiotónicos, se ponen 2g de droga con éter de petróleo, en un aparato soxhlet, con el fin de eliminar sustancias de naturaleza liposoluble. Se deja secar el marco al aire, y se extrae con 10mL de cloroformo, al que se ha añadido un 10% de alcohol de 96°, por agitación durante una hora. Se filtra y el residuo se lava con 5mL de etanol, que se añaden a los líquidos anteriores.

El extracto obtenido se divide en dos alícuotas, sobre las que se ensayan los reactivos de Baljet y Raymond-Marthoud.

* *Reacción de Baljet*: a 2mL de solución se añade 1mL de reactivo (solución de ácido pícrico al 1% en alcohol de 50°). A continuación se añaden III ó IV gotas de solución alcohólica de potasa al 10% (p/v). Este reactivo, en presencia de lactonas insaturadas del núcleo cardenólido, proporciona una coloración roja estable.

* *Reacción de Raymond-Marthoud*: Se sigue la misma técnica que en el caso anterior, operando con el reactivo formado por una solución al 1% de

m-dinitrobenceno en alcohol de 96°, alcalinizando con lejía de sosa alcohólica. La reacción se considera positiva si puede observarse una coloración violeta fugaz.

Resultado: En ambos ensayos de coloración, el resultado obtenido fue negativo, por lo que puede afirmarse que no existen heterósidos cardiotónicos en esta especie.

HETERÓSIDOS CIANOGENÉTICOS

Los heterósidos cianogenéticos (Figura 43) son aquellos que liberan en su hidrólisis ácido cianhídrico ($\text{H}-\text{C}\equiv\text{N}$). Son siempre heterósidos de 2-hidroxinitrilos. La liberación del ion CN^- proporciona a estos compuestos alta toxicidad [114].

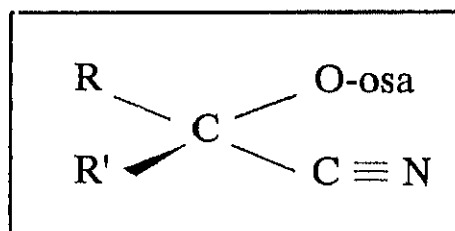


Figura 43. Estructura general de heterósidos cianogenéticos

El resto osídico suele ser glucosa, y en ocasiones un disacárido como gentobiosa o vicianosa. Si es un disacárido, las enzimas presentes en la planta, emulsina [234,235], pueden dar lugar a la hidrólisis en dos fases.

R y R' son alifáticos o aromáticos, en muy raros casos forman un ciclo. Se pueden clasificar, en función del aminoácido precursor, en derivados de valina, fenilalanina, tirosina, y más raramente isoleucina.

En su hidrólisis liberan, en primer lugar el resto glucídico, y posteriormente, la cianhidrina, inestable, genera ácido cianhídrico y un

derivado carbonílico: aldehído o cetona. La hidrólisis enzimática libera un nitrilo, que se descompone a su vez por un proceso no enzimático (Figura 44).

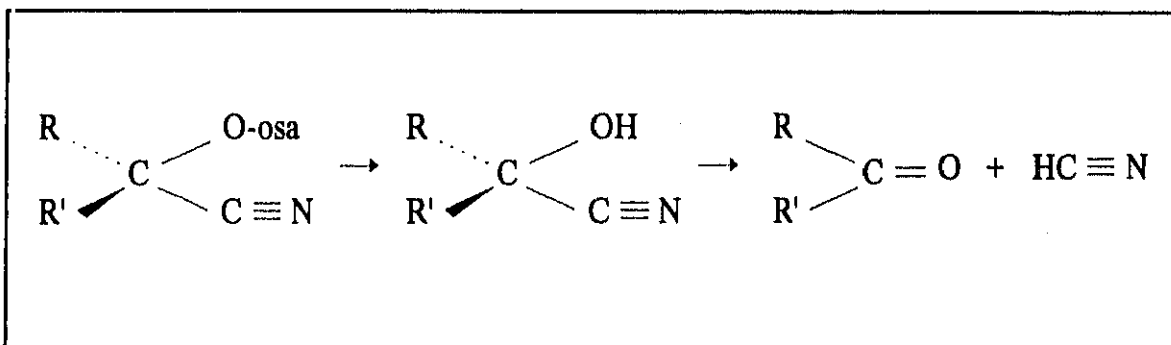


Figura 44. Hidrólisis de los heterósidos cianogenéticos

La investigación cualitativa de estos heterósidos se realiza mediante el método de Guignard, basado en que el papel picrosodado, de color amarillo, vira a rojo en presencia de vapores de ácido cianhídrico, procedente de la hidrólisis de dichos heterósidos [234,235]. Esta coloración roja se debe a la formación de isopurpurato sódico.

Se toman 2g de planta pulverizada y se introducen en un matraz Erlenmeyer de 100mL, provisto de un tapón de corcho. Se añade cantidad suficiente de agua, y en el cuello del matraz se suspende, por medio del corcho, una tira de papel picrosódico (papel de filtro impregnado en una solución de 1g de ácido pícrico en 100mL de solución de carbonato sódico, cristalizado al 10%, en agua), sin que dicho papel toque el agua del matraz. Se calienta a baño maría o llama pequeña directa, hasta observar si se produce cambio de color en el papel.

Resultado: Al no producirse la modificación correspondiente en el papel picrosodado, se deduce que no existen heterósidos cianogenéticos en la droga.

ALCALOIDES

Los alcaloides constituyen uno de los grupos de principios activos más importantes de las plantas medicinales, junto con los heterósidos y antibióticos. Meisner, en 1818, denominó a un producto nitrogenado natural, que tenía la propiedad de dar reacciones alcalinas, *al Kaly* (Kaly=sosa); por tanto, un alcaloide es un producto, de origen vegetal, de comportamiento semejante a álcalis.

Son sustancias orgánicas vegetales, la mayor parte de ellos de naturaleza básica, debido a que son nitrogenados, nitrógeno que, generalmente es heterocíclico aunque existen alcaloides donde el N es extracíclico, llamados amins alcaloídicas o protoalcaloides (por ejemplo, la efedrina). Corrientemente presentan un sólo átomo de N, sin embargo algunos pueden poseer hasta un total de 5.

Al estado de base son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos; en forma de sales, son insolubles en disolventes orgánicos y solubles en agua. La mayoría de los alcaloides se encuentran en los vegetales en forma de sales, unidos a ácidos orgánicos, como citratos, malatos, tartratos, benzoatos... Pueden ser desplazados de estas sales, mediante un ácido fuerte, un ácido mineral. En cualquier caso, tanto en forma libre básica, como en forma de sales, son siempre solubles en alcohol. Las sales son precipitables de sus soluciones por el ácido tánico y los taninos, ácido fosfotúngstico, silicicotúngstico...

Generalmente, poseen actividad fisiológica marcada [114] y una distribución restringida en el Reino Vegetal, por lo común en Dicotiledóneas y particularmente en Papaveráceas, Leguminosas y Apocináceas. Es extraño

encontrar un solo alcaloide en la planta, lo más común es hallar un grupo de bases, de constitución muy similar y que se diferencian poco entre sí, estructuralmente.

Suelen ser compuestos sólidos, fácilmente cristalizables. Los alcaloides que carecen de oxígeno en su molécula son, a menudo, líquidos volátiles, arrastrables en corriente de vapor, y los oxigenados suelen ser sólidos cristalinos, muchos de ellos de sabor amargo, e incoloros.

Presentan propiedades alcalinas, pues los átomos de nitrógeno pueden estar formando parte de aminas secundarias o terciarias, presentando distinto grado de solubilidad dependiendo de la disposición electrolítica del N y la presencia y ubicación de radicales adyacentes, que pueden ser electrón-atrayentes. Los alcaloides, como otros compuestos aminados forman sales dobles con los compuestos de mercurio, oro, platino y otros metales pesados. Sales que pueden obtenerse como precipitados [234], lo cual puede utilizarse para su caracterización, de igual forma que los reactivos yodados obtienen precipitados coloreados que permiten una sencilla valoración cualitativa.

Reactivos

* *Reactivo de Bouchardat*: Se trata de una solución de yodo yodurado; 2g de KI en 100mL de agua, se añaden 11 gotas de yodo metálico, y se agita. En presencia de alcaloides, proporciona un precipitado de color marrón.

* *Reactivo de Mayer*: es el reactivo más específico para el reconocimiento de alcaloides. Formado por yodomercuriato potásico, que se obtiene de la mezcla de 1.35g de Cl_2Hg y 5g de IK, que se disuelven en 30mL de H_2O destilada y se diluyen con agua hasta 100mL. En solución acuosa ácida, da un precipitado blanco amarillento, de aspecto lechoso, revelando la presencia de alcaloides.

* *Reactivo de Dragendorff*: constituido por yoduro de bismuto y potasio; se disuelven 8g de subnitrato de bismuto, en 20mL de ácido nítrico

($d=1.18$), y por otro lado, 27.2g de KI en la mínima cantidad posible de agua; se vierte la solución de bismuto, lentamente, en campana de extracción, y agitando, sobre la de yoduro potásico. Se forma un precipitado que se disuelve dando un líquido rojo amarillento; se filtra tras unas horas de reposo, a baja temperatura, y se diluye con agua c.s.p. 100mL. Este reactivo proporciona un precipitado rojo-ladrillo en presencia de alcaloides [53].

Para la caracterización de alcaloides se realizan dos tipos de extracciones a partir del polvo seco de la droga [83,375].

Extracción acuosa en medio ácido

Se tratan aproximadamente 2g de droga con unas gotas de HCl concentrado y 15mL de agua. Se calienta a baño maría a ebullición, unos 10 minutos. Los alcaloides son desplazados de sus sales con los ácidos orgánicos, se combinan con el ácido clorhídrico, dando la sal, soluble en agua, quedando libres los ácidos orgánicos.

El líquido extractivo se separa del marco, por filtración, desechando el marco y tomando alícuotas del filtrado, sobre las que se ensayan los reactivos específicos de alcaloides.

Extracción en medio alcalino

Se colocan unos 10g de muestra con NH_3 y éter sulfúrico en un Erlenmeyer. De esta forma, los alcaloides, que estaban en forma de sales, pasan al estado de bases libres y, por tanto, son insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos. Se agita con sucesivas fracciones de éter, hasta que la droga no ceda color. Se filtra y el líquido filtrado se lleva a ampolla de decantación. Se añaden 5mL de HCl al 10%, repitiendo esta operación, al menos 3 veces. Sobre los líquidos ácidos, en que se

encontrarán los alcaloides en forma de sales, se realiza la caracterización de alcaloides.

La positividad de las reacciones tras una extracción ácida puede indicar la presencia tanto de alcaloides, como de otras sustancias aminadas; mientras que, tras la extracción alcalina, si los reactivos citados hacen aparecer los precipitados correspondientes, puede confirmarse la presencia de alcaloides.

Resultados: Tras la extracción en medio ácido, los reactivos de Mayer y Bouchardat no proporcionan ningún precipitado, tan sólo Dragendorff provoca un ligero precipitado anaranjado. El resultado de la extracción alcalina reacciona positivamente con los reactivos de Dragendorff (precipitado rojo ladrillo) y Bouchardat (precipitado marrón), aunque el reactivo de Mayer no provoca la aparición de un precipitado, sino un cambio de color en la solución, que pasa a amarilla.

ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL SCREENING FITOQUÍMICO

La fitoquímica del género *Teucrium* ha sido profusamente investigada, como queda reflejado en la revisión bibliográfica realizada.

Sin embargo, prácticamente no existe documentación acerca de la composición cualitativa de la especie *Teucrium buxifolium*, especie objeto de estudio de esta Memoria de Investigación. Se tiene conocimiento de la presencia, en dicha especie, de compuestos de naturaleza terpénica, concretamente dos derivados neo-clerodanos [245,289], y algunos compuestos flavónicos [128].

Al tratarse de una especie poco estudiada se hacía preciso realizar un análisis de la composición cualitativa de la misma.

Para ello, se realizó un screening fitoquímico, mediante reacciones generales de caracterización que ponen de manifiesto los principales grupos químicos presentes en la naturaleza.

Estos ensayos se basan en reacciones sencillas de coloración, precipitación, técnicas sencillas de fluorescencia, formación de compuestos de adición, oxidación y técnicas de cromatografía en capa fina.

Estas reacciones generales de caracterización de compuestos químicos, llevadas a cabo sobre la especie vegetal *Teucrium buxifolium*, han permitido poner de manifiesto la presencia de diversos grupos de sustancias: azúcares, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y compuestos de naturaleza esteroídica y resinas.

Mientras que han resultado negativos los ensayos de: mucílagos, cumarinas, antraquinonas, antocianos y leucoantocianos, heterósidos cardiotónicos, compuestos cianogenéticos, alcaloides y taninos.

La presencia de azúcares es prácticamente invariable en todas las especies vegetales, tanto en forma libre como heterosídica, y esta especie no constituye una excepción, independientemente de que en este género se han encontrado mezclas complejas de glicósidos y compuestos poco usuales, como la halleridona [23], titriacotano [319] y teucríósido [120].

Los ácidos fenólicos identificados en esta especie, han sido el isovainílico y p-hidroxibenzoico, en forma libre y combinada, y el siríngico, en forma combinada, no detectándose, entre otros, ni el cafeico ni el clorogénico, presentes en otras especies del género [98,134].

Los ensayos que ponen de manifiesto la presencia de derivados flavónicos resultaron positivos, así como parecen mas frecuentes las flavonas, hecho que concuerda con la bibliografía encontrada al respecto [128].

Las saponinas se encuentran representadas en el género en diversas especies [146,234,291], a las que habría que añadir el *Teucrium buxifolium*, que ha manifestado positividad en los ensayos cualitativos de saponinas.

Las reacciones de caracterización que permiten poner de manifiesto el esqueleto esteroide sugieren, así mismo, la presencia en la especie de fitoesteroides, de igual forma que en otros representantes del género [35,319,327].

No sucede así con los compuestos cardiotónicos o taninos, a pesar de que estos grupos químicos han sido detectados en el género [146].

Por otro lado, y como ya se ha indicado, de acuerdo con la bibliografía consultada, la especie *Teucrium buxifolium* debe ser rica en diversos compuestos de naturaleza terpénica, al igual que otras especies del género.

En base a dichos datos y a los ensayos fitoquímicos realizados, la actividad antiinflamatoria por la que es empleado el *Teucrium buxifolium* en medicina popular podría ser atribuida a diversos grupos químicos, presentes en la especie, bien a los compuestos de naturaleza terpénica, probablemente formando parte del extracto hexánico de la planta, o bien a compuestos de naturaleza flavónica del extracto metanólico.

En ambos casos, diversos principios de origen natural, pertenecientes a los citados grupos químicos, han demostrado poseer actividad antiinflamatoria, y en ocasiones no ulcorigena.

ESTUDIO FARMACOLÓGICO

ESTUDIO FARMACOLÓGICO

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA FARMACOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Teucrium</i>	137
INFLAMACIÓN	147
CONSIDERACIONES GENERALES	147
SIGNOS CARDINALES DE LA INFLAMACIÓN	149
INFLAMACIÓN AGUDA	150
Fenómenos Vasculares, Componente Celular y Mediadores	150
INFLAMACIÓN CRÓNICA	160
Respuesta Inmune, Artritis Reumatoidea y Mediadores	160
ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ANTIINFLAMATORIAS	170
MATERIAL Y MÉTODOS: ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE <i>Teucrium buxifolium</i>	177
INDUCCIÓN DE ARTRITIS GENERALIZADA	177
Bases Patogénicas: Fase Aguda y Crónica	178
Protocolo Experimental	182
Resultados	186
EDEMA PLANTAR AGUDO	195
Bases Patogénicas	196
Protocolo Experimental	196
Resultados	197
ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	203
ÚLCERA	207
CONSIDERACIONES GENERALES	207
TOXICIDAD GASTROINTESTINAL DE LOS AINE	207
ETIOPATOGENIA DE LA ÚLCERA PÉPTICA GASTRODUODENAL	210
ÚLCERA GÁSTRICA	211
ÚLCERA DUODENAL	216
MATERIAL Y MÉTODOS: ACT.ANTIÚLCEROSA Y CITOPROTECTORA DE <i>Teucrium buxifolium</i>	223
INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA	223
Bases Patogénicas	224
Protocolo Experimental	226
Resultados	229
INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR ETANOL	233
Bases Patogénicas	233
Protocolo Experimental	235
Resultados	239
ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIÚLCEROSA Y CITOPROTECTORA	243

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA FARMACOLOGÍA DEL GÉNERO *Teucrium*

La Familia *Lamiaceae*, con más de 3.000 especies distribuidas por los países cálidos y templados, es bien conocida por sus propiedades, y por tanto usos medicinales. En los distintos tratados de Farmacognosia son mencionadas algunas especies del género *Teucrium*, de típicos aromas montaraces, fuertes fragancias que recuerdan las notas del incienso y del romero, empleadas profusamente en la terapéutica, citándose los teucrios en ciertas leyendas, según cuenta Leclerc [167], por su uso en afecciones febriles y propiedades antisépticas.

La especie *Teucrium buxifolium* no aparece reseñada en los antiguos tratados medicinales, quizá sea poco conocida dada su restringida distribución geográfica, por lo que ha sido preciso orientar este estudio, hacia la revisión de los usos populares de otras especies del género.

Las esencias de estas plantas, potencialmente terapéuticas, podrían poseer actividad antiséptica considerable, en base a su riqueza en monoterpenos, y antiinflamatoria, por los hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados, como en el caso del *T. lusitanicum* var. *aureiformis*, especie que podría incluirse en la flora medicinal española, en caso de confirmarse dichas actividades mediante los ensayos farmacológicos adecuados [351].

La primera referencia encontrada en la literatura, sobre usos terapéuticos de este género, indica que el *Teucrium scorodonia* L. podría falsificar a *Digitalis purpurea* [112], entiéndase desde el punto de vista terapéutico. Font-Quer [98] reseña algunas especies de este género, destacadas por su uso con fines medicinales, como la especie anteriormente citada, conocida vulgarmente como escorodonia. Con las sumidades floridas de la misma se prepara el vino de escorodonia, usado contra la hidropesía. Tonifica y provoca ligera diuresis. Vulneraria y febrífuga, es usada como remedio popular [243]. Vigneau clasifica al *T. scorodonia* como antihipertensivo [355].

La especie *T. chamaedrys* L. constituye uno de los endemismos ibéricos que es usado en Farmacia, según cita La Botánica Aplicada a la

Farmacia [111], siendo también ampliamente utilizado en la medicina popular de Bulgaria [169]. Su nombre popular es camedrio [98] o germandrio de pared, porque crece abundantemente en paredes y ruinas de Europa, Asia y Norte de África [28]. Se considera tónico, estimulante de la digestión y diurético, constituyendo una planta de uso común en preparaciones de licores, por sus características aromatizantes y amargas [63]. En enfermedades intestinales se utiliza como astringente y colerético [291]. Se emplea la sumidad florida como tónico amargo y vulnerario [234,243], recolectando la planta entera, poco antes de su floración. Se utiliza en forma de tisana en el tratamiento de úlceras y para cualquier tipo de inflamación [28]. El estudio de la composición de su esencia revela, que son particularmente abundantes los hidrocarburos sesquiterpénicos, lo que la hace especialmente interesante por su potencial actividad antiinflamatoria, aún pendiente de confirmación [63].

La Botánica Aplicada a la Farmacia [111] también destaca al endemismo *T. botrys*, así como al *T. flavum* L. o teucro amarillo. Haciendo referencia a la obra de Salvador Solina y Joaquín Rodríguez, tomo III (1790) se dice de esta última especie que es "amarga y algo acre, posee la virtud balsámica, tónica, antipútrida, alexiteria, antifebril, revolvente, expelente, diaforética y antihelmíntica". Se usaba fundamentalmente en afecciones cutáneas [98].

T. scordium *Herba Scordii* L., especie también endémica de la Península Ibérica, es empleada en la terapéutica [111], como tónico amargo, febrífugo, astringente, estimulante y vulnerario [234,243].

Es Colmeiro [63] quien relata que los griegos eligieron el término maron para designar al *T. marum* L., y de igual forma los árabes dieron el nombre de al-mar, amaro o maro (de la voz hebrea 'mar' o 'mor') a diversas especies de la familia *Lamiaceae*, entre las que figuraba la especie *T. marum*. Ciertamente, las especies del género *Teucrium* L. presentan amargor, que es posible apreciar de forma notable cuando se pulverizan finamente, para su posterior estudio fitoquímico. El comúnmente conocido como maro, la especie *T. marum* L., es destacada como "gran diurético, diaforético, carminativo, antiescorbútico, emenagogo, excelente cefálico, pectoral, antiasmático, cordial, estomáquico, hepático, esplénico, uterino,

antiespasmódico, afrodisíaco y antihelmíntico" [98]. De todas las especies del género *Teucrium* parece ser la más activa, a juzgar por el amplio uso que se le concedía. Generalmente, se usa como tónico y digestivo. También en homeopatía encuentra su lugar esta especie, usada como vermífugo, así como en algunas especialidades, como tónico amargo estimulante y para combatir la amenorrea y cólicos [25,136].

El empleo de especies de este género en afecciones del tracto digestivo es realmente amplio, según puede verse, como por ejemplo, la especie *T. pyrenaicum* L. o teucro pirenaico, que "facilita la digestión y ataja la diarrea, tomada en forma de tisana" [98].

Pero no sólo en el continente europeo son conocidas las propiedades terapéuticas de las especies de este género, así en China, las hojas de *T. thea* se usan, popularmente, como infusión digestiva [169].

Las especies africanas del género también se han utilizado en medicina popular, *T. capense* Thumb., como estomáquico, tónico, carminativo, antihemorroidal, antipirético y antigripal. Algunas etnias surafricanas lo emplean en infusión, contra mordeduras de serpientes, úlceras de garganta, e incluso, estos nativos, esterilizan carne contaminada con ántrax, hirviéndola con las hojas de la planta. *T. riparium* Hochst. se utiliza en infusión como tónico y emético, y *T. africanum* Thumb. se emplea por sus propiedades tónicas y diaforéticas, como antihemorroidal de uso externo [351].

De carácter prácticamente cosmopolita, es la especie *T. polium* L., ya que los usos etnofarmacológicos de la misma alcanzan a muy diversos países. Endemismo ibérico de uso terapéutico [111], conocida por el vulgo como poleo o zamarrilla. Se considera a esta especie, el *Teucrium polium*, como tónica y estimulante [98], y Quer, en el tomo VI de la Flora Española, indica que es usada en la composición de la triaca y el mitridato, "es diurética y promueve los menstruos, usada también para la curación de la hidropesía". Arizaga relata que antiguamente los monjes Benitos de Valvanera la llamaban la 'Hierba del Humor', usándola con frecuencia como paliativo del reumatismo crónico.

En Francia es célebre desde la antigüedad por sus propiedades medicinales [99], empleada frecuentemente como hipotensor, para el cuidado de los cabellos, tratamiento de afecciones de la vesícula biliar, en forma de emplastos contra la mordedura de serpientes y como antiespasmódico, en diversos tipos de cólicos [353].

De indudable reputación es el valor medicinal que se le concede en Qatar, ya que la decocción de sus hojas es usada como poción fría contra la fiebre, como tónico amargo en afecciones estomacales, especialmente indicado en niños y se aplica también, en forma de emplastos, en heridas abiertas [255].

T. polium, constituye una de las plantas aromáticas más profusamente empleada por la población de Arabia Saudí, como antiespasmódico, antirreumático, carminativo y como condimento. Estudios farmacológicos del aceite esencial de esta especie, mostraron que poseía una potente actividad antiespasmódica, frente a la contracción inducida por nicotina, acetilcolina, histamina y serotonina; mientras que, el extracto acuoso de esta misma especie, presentó una actividad marcadamente inferior que la esencia [132].

Es utilizada como remedio popular, aún en la actualidad, para afecciones estomacales, por los Beduinos del Desierto del Negev (Israel) [101]; para el tratamiento de la diabetes, también en Israel [388]; en Grecia, para tratar afecciones febriles, dolor de estómago, cistitis e hipertensión [192], hipotensor y hemostático en metrorragias [354] ; como anorético [24]; por sus efectos hipoglucemiantes... Esta última actividad hipoglucemiante fue comprobada experimentalmente en ratas [109], así como también el efecto anorético [110] y la actividad calcio-antagonista [12] y sobre la motilidad intestinal y presión sanguínea [316], observando que el aceite esencial de esta planta no inhibe la contracción provocada por noradrenalina, en aorta de conejo y cobaya [99].

También se cita al *T. polium* L. en un screening realizado sobre antiinflamatorios de origen natural [293]. Esta planta, es usada en la medicina popular de Arabia Saudí para el tratamiento de inflamaciones,

reumatismo y úlceras. Además se emplea contra la diabetes, de igual forma que la especie *T. oliverianum*, cuya decocción y extracto etanólico reducen los niveles sanguíneos de glucosa, dosis/dependiente, en ratones sujetos a diabetes experimental y daño pancreático parcial [3].

Un preliminar estudio farmacológico y toxicológico sobre *T. polium* demuestra que posee cierta actividad parasimpaticolítica, en duodeno de conejo y ligera acción hipotensora, dejando constancia de la baja toxicidad observada en estudios neuropsicofarmacológicos sobre ratón, y presentando como único inconveniente, sus efectos atropínicos.

Tariq *et al* [327] confirman algunos de estos usos, demostrando, por un lado, un descenso en los niveles sanguíneos de glucosa, así como una significativa inhibición de la inflamación, mediante dos modelos experimentales. Sin embargo, el grupo de Capasso, utilizando uno de los métodos que habían empleado en el trabajo recién comentado, llega a la conclusión de que esta especie presenta una actividad antiinflamatoria no muy destacable, por lo que se justificaría que su empleo se redujese, tan sólo, a afecciones febriles ligeras [53].

Aunque estos resultados podrían parecer contradictorios, no tiene porqué llegarse a dicha conclusión, puesto que, aunque en ambos casos se utiliza un mismo extracto alcohólico de la droga, de los trabajos publicados no puede extraerse la dosis concreta de planta seca/Kg animal, utilizada en los respectivos estudios.

La conclusión a la que llega el grupo de Capasso les hace ahondar en el estudio del *T. polium* L., puesto que si el uso popular del mismo se refiere a afecciones febriles de poca índole, ello hace suponer una cierta actividad antipirética, e incluso antimicrobiano. Por ello, realizan un trabajo que viene a demostrar la actividad antipirética dosis/dependiente, frente a la pirexia provocada por levadura y carragenina, aunque con actividad algo menor a la presentada por el patrón de referencia, indometacina. *T. polium* L. posee actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram(+): *Bacillus subtilis*, *B. anthracis*, *Staphilococcus aureus*, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*, y Gram(-): *Escherichia coli* 7075,

E. coli Bb, *Proteus mirabilis* y *Salmonella tiphy* H., no observándose inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Al mismo tiempo, estos autores realizan un sencillo estudio de toxicidad aguda por vía oral, en el cual queda constancia de una mortalidad nula en los animales, a la dosis empleada [17].

Por otro lado, también la especie *T. chamaedrys* es objeto de recientes investigaciones, por ser usada tradicionalmente como planta medicinal, en forma de decocción, como febrífugo, y conocida con el nombre común de 'cersolla', en la provincia de Caserta (Italia) [92]. Dicho uso podría ser justificado, al menos en parte, por la actividad antimicrobiana presentada por esta especie, frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Mycobacterium phlei*, con una CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de 12.7g planta seca/litro cultivo [251].

La especie *Teucrium pillosum* parece presentar una actividad mitótica, demostrada sobre una cepa del género *Allium* [297]. Este estudio se halla dentro del marco de una investigación, también sobre plantas de uso popular en terapéutica, concretamente en Qatar.

El ácido rosmarínico se detecta con frecuencia en especies de la familia *Lamiaceae* y se le ha atribuido actividad antibacterial, antiinflamatoria y antioxidante. Este compuesto suele aparecer acompañado de derivados hidroxicinámicos y no ha sido detectado en la subfamilia *Ajugoideae*, a la que pertenece el género *Teucrium*; sin embargo, sí se ha comprobado la actividad antioxidante de algunas especies de este género [170]. Es posible que esta actividad frente a radicales libres se deba a los derivados del ácido cinámico o bien a flavonoides, ya que la relación entre actividad antioxidante y ácido rosmarínico aún es discutida.

La inhibición de la aldosa reductasa, ejercida por ciertos compuestos de naturaleza flavónica, parece directamente relacionada con una reducción de las cataratas. Concretamente, en un estudio con diversas especies de la familia *Lamiaceae*, una metoxiflavona aislada de la especie *T. gnaphalodes*, demostró una potente inhibición de la actividad de dicha enzima [332].

No sólo las especies de *Teucrium*, como planta entera, suscitan interés entre la comunidad científica, sino también los diterpenos aislados de las mismas, cuya importancia reside en su actividad biológica como antifúngicos, antitumorales, antimicrobianos, molusquicidas e insecticidas. Pueden tomarse como ejemplo el caso de teucvina y teucvidina, que demuestran potente actividad bactericida frente a Gram(+); así mismo, el diterpeno teucvina se comporta como amebicida *in vitro* [103].

Por otro lado, también es de destacar el reciente interés suscitado por diversas especies del género *Teucrium* [21,126,302], y más concretamente por algunos de sus principios activos aislados [302], también diterpenos, por su actividad 'antifeedant', demostrada frente a larvas de diversas especies de insectos, muchos de estos motivo de preocupación, por las plagas de Lepidópteros, que podrían ocasionar graves daños en la Agricultura. Otros diterpenos, aislados de *Ajuga remota* [159] y *Ajuga chamaepitys* (15-etoxi-14-hidroajugapitina y 14,15-dihidroajugapitina) [54], han demostrado poseer dicha actividad, frente al gusano egipcio de las hojas de algodón (*Spodoptera littoralis*), por lo que se procedió al estudio de la misma en diterpenos aislados de *Teucrium*, los cuales se presentan con frecuencia en dicho género. Concretamente el diterpeno teucjaponina A, demostró potente actividad frente a *Prodenia litura* [208], y tafricanina A y B mostraron actividad 'antifeedant' frente a larvas de *Locusta migratoria*, siendo más acusada en el caso de tafricanina B [126]. Estos estudios, en la actualidad, están encaminados a encontrar la relación que existe entre estructura/actividad, puesto que ciertos cambios en la estructura molecular provocan variaciones en la inhibición de la alimentación de estas larvas.

Algunas especies de la familia *Lamiaceae* han sido utilizadas, desde tiempo antiguo, como plantas medicinales para el tratamiento del cáncer [131]. Por ello, se pensó en la posibilidad de una actividad antitumoral de derivados terpénicos aislados de especies de esta familia, y mientras que, algunos de ellos procedentes del género *Rabdosia*, presentan actividad frente a la leucemia linfocítica P388, inoculada a ratones, no ocurre así en el caso de los neo-clerodanos teucvina, teucvidina [215] y el iridoide teucardósido [255], aislados de especies del género *Teucrium*.

El harpágido y derivados glicosídicos del mismo, han sido puestos de manifiesto en especies del género *Teucrium* [152,255], constituyendo este iridoide una molécula de especial interés farmacológico por su actividad antiinflamatoria y antiartrítica.

Por otro lado, y a pesar de todas las aplicaciones terapéuticas que la medicina natural ofrece, esto no implica que esté exenta de todo efecto perjudicial. Tal es el caso de la especie *Teucrium chamaedrys*, ya que en contraposición al uso popular que recibe como lipolítico [261], se han registrado varios casos clínicos de hepatotoxicidad [59,80,172,239,354]. Huxtable lo incluye dentro de las preparaciones medicinales de origen natural que podrían suponer para la salud más riesgo que beneficio [144]. Esta especie se emplea en forma de infusión o tisana, como anorético en terapias de adelgazamiento, ya que parece facilitar la pérdida de peso [59,173]. Tras un período de tratamiento, comprendido entre uno o dos meses, se han detectado en Francia, generalmente en mujeres jóvenes, varios casos de hepatitis aguda con necrosis de hepatocitos y severas lesiones, cuadro clínico que podría estar provocado por el uso de esta especie, ya que no se han encontrado en estos pacientes ninguna otra causa de daño hepático. Los elevados niveles plasmáticos de transaminasas y la ictericia, así como la sintomatología, remiten tras la supresión de la ingesta del *Teucrium chamaedrys*.

La exhaustiva farmacovigilancia, realizada sobre dichos enfermos, ha permitido demostrar la reincidencia en los síntomas tras instaurar nuevamente el tratamiento con esta especie, reapareciendo la hepatitis [80,173]. De todas formas no existían, hasta el momento, datos acerca de la posible toxicidad de las germandrinas, por lo que no se descarta una contaminación externa con algún producto no identificado, aunque aún no ha sido demostrado [80]. Como medida preventiva, el Ministerio de Sanidad de la República Francesa tomó la resolución de prohibir, en todo el territorio nacional, el empleo de aquellos productos de uso medicinal que contengan germandrinas en su composición.

Con respecto a la especie objeto de este estudio, *Teucrium buxifolium* Schreb., popularmente conocida como 'teucrio de roca' [15], no se habían encontrado referencias bibliográficas con respecto a su farmacología, por lo que fue incluida en un screening antiinflamatorio que puso de manifiesto una potente actividad inhibitoria del proceso experimental de inflamación [9], que podría justificar el empleo popular que de ella se hace, en la región levantina de la Península Ibérica, zona de la cual es endémica. Los prometedores resultados, obtenidos en dichas pruebas preliminares, obligaban a profundizar en su investigación.

INFLAMACIÓN

CONSIDERACIONES GENERALES

La inflamación es un proceso fisiopatológico, consecutivo a la lesión de los tejidos y proporcional al daño del mismo. Innumerables cuadros patológicos cursan con algún síntoma de inflamación, como respuesta a una agresión exógena o endógena. El mecanismo bioquímico de la inflamación ha preocupado siempre al hombre, puesto que la frecuencia de la patología inflamatoria y las graves consecuencias que comporta (conduce a la secuela cicatricial), son suficientemente considerables.

En toda respuesta inflamatoria existe un estímulo mecánico, físico o químico, agente dañino o lesivo, denominado con el término general de noxa. La noxa provoca una reacción local conectivo-vascular, que consiste en un proceso dinámico, en el que están interconectados entre sí fenómenos vasculares y celulares, que tienen como objetivo común eliminar o neutralizar la lesión y mantener o recuperar la función del tejido u órgano afectado.

En principio, esta respuesta constituye un mecanismo de defensa del organismo, que tiende a impedir la diseminación de los factores patógenos; pero un desarrollo inadecuado o excesivo, puede ser deletéreo e incluso llegar a formar parte del propio proceso patológico.

Se desencadena una complejísima serie de reacciones que, en su inicio comienza con cambios en el flujo sanguíneo, fenestración de los microvasos, aumento de permeabilidad vascular, con filtración de elementos sanguíneos en los espacios intersticiales y migración secuencial de poblaciones leucocitarias al tejido inflamado, conduciendo todo ello a la formación de edema local.

En la zona lesionada van a actuar una serie de sustancias, denominadas mediadores de la inflamación, que se forman o liberan al tiempo o en etapas sucesivas. Estos mediadores químicos son generados a través de fuentes plasmáticas y celulares, en respuesta al estímulo nocivo. Suelen ser de acción potente, pero fugaz, ya que son eliminados rápidamente por sistemas

enzimáticos catabólicos, así como por dilución en los fluidos extravasculares. Estos mediadores modifican y modulan la respuesta defensiva vascular y celular, son responsables de la evolución y agravamiento del proceso inflamatorio y son capaces de desencadenar otros mecanismos implicados y/o atraer distintos tipos de células sanguíneas a la zona.

El plasma es la fuente de tres sistemas de mediadores, las kininas, sistema de coagulación y sistema de complemento, que intervienen de una forma u otra, en los procesos flogísticos. Otros mediadores son derivados de distintas poblaciones celulares, pueden ser formados y almacenados en gránulos -histamina en células mastocíticas- o bien sintetizados en el momento por ciertas células -linfokinas, leucotrienos, factor de activación plaquetaria. Los mediadores de naturaleza lipídica, eicosanoides, son sintetizados en células previamente estimuladas [174].

Puede decirse, por tanto, que la inflamación es una respuesta de defensa del organismo, en la que se dan una serie de alteraciones hemodinámicas, vasodilatación e incremento de permeabilidad vascular, que conllevan a su vez una infiltración celular, todo ello acompañado y potenciado por la liberación de un conjunto de sustancias que amplifican y modulan el proceso. Los mediadores provocan los fenómenos vasculares y celulares, y este componente celular produce y libera estos mediadores [174].

Se puede afirmar que existe una fina conexión entre los fenómenos vasculares, quimiotaxis y liberación de mediadores y se pueden generar mecanismos en cadena o cascada, que facilitan el automantenimiento de la inflamación, fundamentalmente si el agente causal persiste o no ha sido posible eliminarlo, entrando entonces en juego una serie de eventos inmunológicos que provocan la cronificación del proceso. Por otro lado, en la inflamación crónica participan distintos tipos de leucocitos, que emigran hacia el foco inflamado -neutrófilos, macrófagos y linfocitos- haya o no, un componente inmunitario.

SIGNOS CARDINALES DE LA INFLAMACIÓN

A nivel macroscópico, se observan una serie de signos clínicos que Celso, ya en el siglo I de nuestra era, definió como tumor, calor, rubor y dolor, añadiendo Galeno el quinto signo, como impotencia funcional. En clínica, estos signos se conocen de forma específica como edema, hipersensibilidad, eritema, hiperalgesia o dolor y destrucción tisular. Esta sintomatología es la que se define como causada por lesiones reales de los tejidos. Pero en la práctica clínica se observan inflamaciones, que podrían llamarse patológicas, sin lesión alguna hística y en la que si, por medios terapéuticos, se inhibe la inflamación, se impide también todo el proceso patológico, apareciendo la zona afectada por completo sana, ya sea una articulación reumática, una urticaria alérgica...

El calor y enrojecimiento son una manifestación de la vasodilatación y del incremento de riego sanguíneo que se produce.

El dolor es debido a la estimulación local de los receptores térmicos, mecánicos y químicos de la zona damnificada.

El edema, a su vez, es consecuencia directa del incremento de permeabilidad vascular que conlleva una extravasación plasmática de fluidos y proteínas, así como una migración celular [107].

La pérdida de función en el tejido lesionado se ocasiona por la destrucción tisular, debida a los productos celulares tóxicos y proteasas específicas [36].

INFLAMACIÓN AGUDA

Fenómenos Vasculares, Componente Celular y Mediadores

El proceso inflamatorio comienza de la siguiente forma, el agente o estímulo nocivo toma contacto con cualquier estructura del organismo, es detectado por las células que, a través de la red de segundos mensajeros [379], provocan la secreción de algunos de los mediadores de la inflamación, de tal forma que el agente lesivo actúa sobre los receptores celulares, y el transductor de membrana, a través de proteínas G, provoca la estimulación de enzimas, con la consiguiente producción de inositol trifosfato y diacilglicerol. Esto provoca una movilización del Ca^{2+} intracelular y activación de una proteinkinasa C y GMP_c . Se producen, por tanto, cambios en la membrana celular que originan la secreción de enzimas lisosomales, generación de radical superóxido y mediadores celulares.

Todo ello desencadena una serie de **FENÓMENOS VASCULARES** que comienzan con una vasoconstricción pasajera de origen adrenérgico, seguida de vasodilatación local y aumento del flujo sanguíneo, que precede a un enlentecimiento y posterior estasis. Aumenta la permeabilidad vascular en el endotelio de vénulas postcapilares, con exudación de fluido y migración de proteínas plasmáticas, lo que provoca el edema local. La vasodilatación es debida, en estas primeras etapas, a la acción de los mediadores liberados y los neutrófilos, en etapas posteriores, ayudan a que la respuesta se prolongue, provocando en vénulas postcapilares el incremento de permeabilidad vascular [233].

Los mediadores implicados en estos fenómenos vasculares son fundamentalmente las aminas vasoactivas, **histamina** y **serotonina**, que son los primeros mediadores que aparecen en la respuesta inflamatoria. La lesión celular provoca en basófilos y mastocitos la liberación de la histamina; la serotonina, aún más activa que la histamina, es liberada por plaquetas. Incrementan la permeabilidad vascular en vénulas y la contracción de músculo liso. A esta actividad, la histamina añade su potencia como importante factor quimiocinético [107,174].

Al tiempo, se liberan proteasas de los lisosomas, que desdoblan las 41-150 proteínas, con formación de sustancias de pequeño peso molecular. Las células endoteliales vasculares son lesionadas, se hacen tumefactas, estrechándose la luz vascular (incluso se oblitera, por acúmulos de leucocitos y plaquetas), por lo que sobreviene la anoxia y el metabolismo celular se vuelve anaerobio, lo que conduce a una presión osmótica elevada y descenso del pH, óptimo para la actuación de las enzimas lisosomales [174].

Aproximadamente a las dos horas del inicio del proceso inflamatorio son liberadas las kininas, destacando entre ellas la bradikina. Este grupo de sustancias son potentes vasodilatadores, que provocan también migración leucocitaria, por acción directa sobre las células endoteliales, además de poseer una marcada actividad álgica. El factor XII de coagulación o factor de Hageman, es activado por contacto con superficies extrañas, actúa sobre el calicreinógeno para transformarlo en calicreína, que activa al kininógeno I, dando lugar a los péptidos bradikina o calidina I y II. El sistema de coagulación, a su vez, estimula, a través de la trombina, al sistema del complemento y al fibrinolítico.

La cascada enzimática del sistema del complemento, está formada por un conjunto de proteínas séricas conocidas como anafilotoxinas, los componentes C_{3a} y C_{5a} provocan secrección de mediadores, fundamentalmente histamina de células mastocíticas, al tiempo que C_{5a} provoca quimiotaxis de leucocitos. El llamado péptido intestinal vasoactivo, además de producir vasodilatación, potencia el edema inducido por C_{5a} y bradikina [174].

El sistema fibrinolítico, por su parte, limita la extensión del proceso a través de la fibrina. El factor de Hageman provoca la cadena de reacciones que produce la transformación del fibrinógeno en fibrina. Ésta bloquea los espacios tisulares y linfáticos de la zona, aumentando el estasis vascular e impidiendo la reabsorción del edema.

El factor de agregación plaquetaria (PAF), concretamente el isómero natural R, constituye un potente mediador en procesos inflamatorios y alérgicos [34], ya que actúa a muy baja concentración; induce la formación de edema, por incremento de la permeabilidad vascular y generación de

mediadores de la inflamación, como prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) [60] y radical superóxido de neutrófilos [174]. Provoca la agregación plaquetaria y de neutrófilos y contracción de fibra muscular lisa.

Los leucotrienos LTC₄ , LTD₄ , y LTB₄ también parecen intervenir en el incremento de permeabilidad vascular y las prostaglandinas poseen acción vasodilatadora, siendo posible que exista una acción sinérgica entre bradikina y PGE₂ o LTB₄ , que favorezca la evolución de la lesión inflamatoria [37].

EL COMPONENTE CELULAR de la inflamación comienza a florecer, ya que la vasodilatación y quimiotaxis favorecen la migración de leucocitos al área inflamada. Inicialmente emigran los leucocitos **polimorfonucleares (PMN) -neutrófilos, eosinófilos y basófilos-** y más adelante, las células **mononucleares -monocitos y linfocitos**. Además, en el proceso inflamatorio intervienen también células tisulares -**células endoteliales, mastocitos y macrófagos tisulares**.

Los PMN son las primeras células sanguíneas que aparecen en el área inflamada. Los péptidos quimiotácticos y el C₅_a se unen a receptores específicos de la membrana, provocando la adhesión de los PMN al endotelio y posterior migración a través de la pared vascular [156]. Cuando son estimulados liberan productos lisosomales, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y radical superóxido [350]. Las enzimas lisosomales contribuyen claramente al daño tisular y degranulación celular, siendo activas a un pH óptimo de carácter ácido [174].

Es en este momento, cuando los factores quimiotácticos ejercen plenamente sus funciones, polarizando la migración hacia el foco lesionado. Actúan en la quimiotaxis productos tan variados como pueden ser las linfokinas y enzimas lisosomales, liberados por linfocitos, aniones superóxido, el C₃_a , C₅_a , las citokinas y eicosanoides, productos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, como son las prostaglandinas, prostaciclina y el LTB₄ , sintetizados por la cicloxigenasa y lipoxigenasa. La presencia de todos estos mediadores quimiotácticos puede estimular una

mayor producción celular de LTB_4 , con lo que se potencia la quimiotaxis [38].

Plaquetas, leucocitos y células endoteliales poseen capacidad para movilizar el ácido araquidónico (AA) y transformarlo en eicosanoides, productos de marcada actividad biológica [195], a través de la enzima fosfolipasa A_2 (PLA_2). Esta enzima es calcio-dependiente, actuando en un rango de pH neutro a alcalino [247], por lo que se activa por estímulos no específicos, como daño celular, en los que se libere Ca^{2+} a través de membrana [380]. La acción de la PLA_2 [61] sobre los fosfolípidos de membrana, provoca la liberación del ácido araquidónico. Hasta el momento había constancia de la PLA_2 como enzima secretora, de bajo peso molecular (14-16 KD), identificada en exudados inflamatorios y fluido sinovial humano de pacientes de artritis reumatoidea. Más recientemente, se ha descrito la PLA_2 citosólica, caracterizada por ejemplo en macrófagos y cuyo peso molecular alcanza los 40 KD [247]. Esta enzima sufre un proceso de traslocación a membrana Ca^{2+} -dependiente, y parece ser que la forma citosólica es la enzima vital en la liberación del AA, a partir de los fosfolípidos de membrana. El AA puede metabolizarse a través de dos rutas enzimáticas, mediadas por la cicloxigenasa (CO) y la lipoxigenasa (LO) [275], para formar importantes mediadores de la inflamación, las PG y LT, respectivamente. La inhibición de cualquiera de estas enzimas, CO y LO, a través de inhibidores específicos o duales [139,273] y la inhibición de PLA_2 [31] tendrá por tanto un importantísimo papel en el control de la respuesta inflamatoria.

A través de la vía de la CO o PGsintetasa, presente en la fracción microsomal de la mayoría de las células [273], se van a formar los mediadores por excelencia de la inflamación, las prostaglandinas (PG), así como las prostaciclina (PGI_2) y los tromboxanos (TX) [12,171]. Durante el proceso de oxidación enzimática del AA se liberan radicales libres de oxígeno [248], capaces de provocar irreparables daños celulares, aunque por otro lado, la liberación de radical hidroxilo parece inactivar la CO, por lo que constituye un control 'feedback' negativo de la síntesis de PG [32].

Datos recientes aportan dos posibles formas de la enzima CO. Una de ellas es la forma enzimática de la que, hasta ahora, se tenía conocimiento, denominada actualmente como COX-1, fue aislada por primera vez de vesículas seminales y está codificada por un mRNA de 2.8 kilobases; la segunda es la COX-2, enzima mitógeno-inducible, que está codificada por un mRNA de 4 kilobases [176].

Se ha observado que, en los macrófagos no estimulados, es posible detectar tan sólo la COX-1, mientras que si estas células son estimuladas por lipopolisacáridos (LPS), procedentes generalmente de bacterias, existe una expresión inducida de COX-2. Es decir, que la potenciación que existe de la síntesis de PG y TX, en macrófagos estimulados por LP, proviene de la expresión selectiva de COX-2. Por otro lado, un aumento en la síntesis de PG en células estimuladas por mitógenos se acompaña de una inducción en la expresión celular de CO [176].

Por tanto, parece ser que la COX-1 puede detectarse en condiciones normales, en estado sano, mientras que la COX-2 es inducida en células endoteliales y fibroblastos sinoviales en los procesos artríticos, por agentes proinflamatorios, como la interleukina IL-1. Por ello, puede decirse que el isotipo COX-2 es el que se encuentra asociado a los fenómenos inflamatorios, y de hecho su nivel se está incrementado tanto en la artritis experimental inducida, como en enfermos reumáticos [185].

En el grupo de las prostaglandinas, la PGE_2 constituye el prostanoide más importante, aunque $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ y TXB_2 , también aparecen implicados en la respuesta inflamatoria, así como en procesos alérgicos [273].

Dentro de los productos de la CO, la PGE_2 y PGI_2 son los prostanoideos de mayor relevancia, debido a su potente actividad vasodilatadora [22], siendo responsables directos del eritema característico de la respuesta inflamatoria de tipo agudo [273]. PGE_2 es, además, un vigoroso agente pirógeno.

Aunque las prostaglandinas no reproducen dos importantes signos cardinales de la inflamación, incremento de permeabilidad vascular y dolor [177], Vane y colaboradores descubren en 1971, que la inhibición de la síntesis de prostaglandinas reduce la respuesta inflamatoria [97,349] y posteriormente, se comprueba que las PG potencian el dolor y el incremento de permeabilidad vascular, provocado por otros mediadores [211,382], y actúan de forma sinérgica con el componente C_5a [381].

La PGE_2 y PGI_2 favorecen la formación de edema y la infiltración de leucocitos, ejerciendo acción vasodilatadora, por lo que promueven el flujo sanguíneo en la región inflamada. Potencian el dolor producido por kininas, bradikina fundamentalmente, y otros autacoides [22,381].

PGE_1 y PGF_1 inducen la formación de AMP_c y GMP_c , respectivamente, favoreciendo así la inflamación [22]. La elevación del nivel de AMP_c estimula la producción de IL-1 en monocitos [133], citokina de importante actividad en la respuesta inflamatoria. Los TX contribuyen a la migración de PMN, iniciando la agregación plaquetaria y favoreciendo la adhesión endotelial.

Por la vía de la LO se sintetizan, también con liberación de radicales libres [350], los leucotrienos (LT), lipoxinas y los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE) [168,329].

Existen distintas formas de la enzima LO, 15-LO de soja, identificada también en otras fuentes vegetales y 12- y 5-LO de origen animal. La 12-LO de plaquetas posee como sustrato preferente al AA y da lugar a la formación del 12-HETE.

A través de la 5-LO, presente en PMN eosinófilos y basófilos, monocitos, macrófagos, queratinocitos y mastocitos, se generan los leucotrienos y lipoxinas [236]. La 5-LO es también una enzima que precisa calcio para su activación.

Mientras que las prostaglandinas son potentes vasodilatadores, con leves efectos sobre la migración leucocitaria, los leucotrienos son potentes quimiotácticos, fundamentalmente el LTB_4 .

Dentro del grupo de los leucotrienos, el más conocido es el LTB_4 , potente quimiotáctico y quimiocinético, capaz de inducir en PMN la liberación de aniones superóxido y provocar un aumento de los niveles de interleukina IL-1, importante mensajero químico relacionado con la respuesta inmune [328].

El LTB_4 , por tanto, es generado y liberado en la respuesta inflamatoria, respuesta que a su vez amplifica [160]. Los neutrófilos generan LTB_4 que a su vez puede atraer a otros neutrófilos [381].

Se ha sugerido una acción sinérgica, aunque independiente, para el C_5a y el LTB_4 , en el reclutamiento y adhesión de PMN [202]. El LTC_4 , producido por los eosinófilos, incrementa la contracción de músculo liso, y ambos LT pueden ser liberados por monocitos y macrófagos [16].

El Factor SRS-A, conocido como sustancia de reacción lenta de la anafilaxia, formado por LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 , induce una ligera respuesta edematógena, que se ve fuertemente incrementada por interacción con PGE_1 y PGE_2 . El LTD_4 posee actividad vasoconstrictora, en contraste con la potente actividad vasodilatadora de otros mediadores, como la histamina, siendo aún más potente el LTC_4 . Ambos leucotrienos incrementan de forma notable la permeabilidad vascular, aunque es más activo el LTD_4 [381].

Las lipoxinas inhiben la formación de otros productos de la ruta de la LO, como el LTB_4 , por lo que se sugiere que poseen un papel modulador, especialmente en reacciones inmunológicas, afectando a los receptores de LT [67,274]. No se conoce exactamente el alcance de las lipoxinas en la inflamación, aunque favorecen la formación experimental de granulomas y estimulan la generación de TX por PMN [68].

Los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE) modifican diversas actividades de neutrófilos y basófilos, aumentando los niveles de GMP_c , estimulan la entrada de Ca^{2+} a la célula y movilizan el Ca^{2+} intracelular, favoreciendo la liberación de histamina de basófilos y otros mediadores de mastocitos. Tanto 12-HETE, como 5-HETE poseen actividad quimiotáctica sobre leucocitos PMN.

El 15-HPETE y 15-HETE, productos de la 15-LO parecen inhibir la acción de la 5-LO, aunque con menor efectividad que el 5-HETE. También parecen tener actividad inhibidora de esta enzima los LTB_4 y C_4 , estableciendo todos ellos un control feedback negativo sobre la LO [236].

La reacción inflamatoria se ve por tanto, potenciada por los eicosanoides debido a la actividad vasodilatadora de PGE_2 y PGI_2 , vasoconstrictora de TX, LTC_4 y LTD_4 , incremento de la permeabilidad vascular de LTB_4 , LTC_4 y LTD_4 y quimiotaxis neutrofílica de LTB_4 [381].

En las primeras fases de la inflamación los monocitos/macrófagos y células epiteliales y endoteliales, liberan citokinas, fundamentalmente interleukina-1 (IL-1), y los monocitos y macrófagos, el factor de necrosis tumoral (TNF). La IL-2 es generada por células T y constituye un factor de crecimiento de otros linfocitos y la IL-3 se conoce como factor estimulante de colonias.

Las citokinas son moléculas proteicas que poseen un indiscutible papel como comunicadores intercelulares, con posibilidad de alterar la función celular [179].

La IL-1 posee una significativa importancia, tanto en fase aguda, como crónica [13]. El papel que juega la IL-1 en la inflamación aguda, es debido a la inducción de permeabilidad vascular y acumulación de neutrófilos que ocasiona. Es un potente quimiotáctico de neutrófilos y monocitos.

No está claro si también el TNF cumple igual misión, pero ambos aumentan la adherencia de neutrófilos al endotelio vascular. Por otro lado, inhiben la síntesis de plasminógeno y potencian la de inhibidores de su activación, con lo que provocan un aumento de la coagulación y descenso de la fibrinólisis. El TNF, aunque no la IL-1, favorece la destrucción de parásitos por activación de eosinófilos, mientras que la IL-1 activa a las células NK [30].

IL-1 es capaz de inducir fiebre, por actuación posiblemente a nivel de los receptores hipotalámicos. El TNF provoca necrosis hemorrágica de tumores, mientras que la IL-1 es menos efectiva destruyendo células tumorales.

Las citokinas poseen una marcada actividad en los procesos de inflamación crónica, como se describirá posteriormente. Participan en los procesos de restitución y defensa del organismo, por lo que por un lado pueden inducir lesión tisular, pero por otro facilitan la regeneración del foco dañado [30].

Otras citokinas pueden modular los efectos de IL-1 y TNF, como puede ser el interferon- γ (IFN- γ). La IL-6 también se considera una citokina de carácter proinflamatorio [179].

Los radicales libres (RL) se definen como especies químicas altamente reactivas e inestables, que poseen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo [123]. Son productos comunes del metabolismo celular [158] y se consideran responsables del daño tisular, degradación de DNA y ácido hialurónico, destrucción de células endoteliales por promover la labilidad de la membrana, incremento de permeabilidad vascular... [350], con activa participación en los procesos inflamatorios [32,137,303].

Aunque también es cierto que los RL pueden llegar a desarrollar acciones beneficiosas, como puede ser la eliminación de complejos inmunes o sustancias de origen microbiano, poseen sin embargo, capacidad citotóxica sobre bacterias y pueden inactivar virus [137].

La toxicidad de los RL como mediadores de la inflamación, radica en que provocan la peroxidación lipídica, potenciando y modulando la síntesis de PG, modifican estructuras proteicas provocando cambios conformacionales, que incrementan la susceptibilidad a la proteólisis e inducen la fragmentación de glucosaminoglicanos. Además, el daño ocasionado a DNA puede provocar incluso la inducción de un proceso autoinmune [32].

La acción independiente, conjunta y/o sinérgica de todos estos mediadores y elementos celulares, conducen a la formación del edema. La

sangre capilar se concentra y enlentece, se acentúa la exudación plasmática y los leucocitos atraídos se disponen sobre las paredes (marginación) y las atraviesan (diapédesis), para así alcanzar el foco inflamatorio y ejercer su acción fagocitaria sobre los agentes patógenos. La reabsorción del edema está además coartada por la fibrina formada, que obstruye los pequeños vasos y cierra los poros.

Todo ello constituye un entramado de mediadores y células, que parecen hacer de esta reacción de defensa del organismo, un círculo vicioso que se abre cuando desaparece la causa, ya sea por destrucción del agente lesivo por fagocitosis, eliminación al exterior, o bien reabsorción de las sustancias irritantes.

En este proceso de restitución es fundamental la lisis de fibrina, por la puesta en juego del sistema fibrinolítico, con activación del plasminógeno en plasmina, a través del factor de Hageman. La permeabilidad vascular, que se había visto disminuida por la obstrucción de fibrina, vuelve a incrementarse, con reabsorción del exudado. Comienza una proliferación de fibroblastos y capilares neoformados, restituyéndose el tejido lesionado.

Los mecanismos de reparación llevan a una regeneración, que puede ser íntegra o bien con cicatrización epitelial y del tejido conectivo fibroso, o incompleta, si ha habido muerte tisular.

INFLAMACIÓN CRÓNICA

Respuesta Inmune, Artritis Reumatoidea y Mediadores

La inflamación es un proceso de defensa con capacidad de autolimitarse, sin embargo cualquier causa que provoque una activación anormal de los fagocitos, daría lugar a una respuesta que puede ser devastadora. La cronificación de esta respuesta inflamatoria frente a un estímulo lesivo, será debida a la imposibilidad de eliminar al agente causal de la reacción de defensa, con la inequívoca implicación del sistema inmune en la fisiopatología del proceso.

Es característico de la inflamación crónica, el edema con infiltración de neutrófilos [107]. La proliferación de tejido granulomatoso, con abundante exudado, monocitosis con numerosas células gigantes multinucleares, formadas por la fusión de macrófagos, linfocitos y acúmulo de células plasmáticas, son algunos de los acontecimientos que tienen lugar en el foco inflamatorio. Existe una discreta acidosis, con ligeras modificaciones de la presión osmótica.

La invasión de tejido conectivo provoca fibrosis y, si el tejido lesionado tiene capacidad de autorregeneración, se puede producir hiperplasia del tejido conectivo adyacente. En ocasiones, según la zona y naturaleza del proceso crónico, puede haber hiperplasia del sistema retículoendotelial y linfoide. La cronicidad de la inflamación depende en gran medida de la formación de mucopolisacáridos ácidos (hialurónico, condroitinsulfúrico) en el tejido conectivo.

Se ha observado que la inflamación crónica podría suponer cambios en los procesos transcripcionales de ciertos péptidos neurotransmisores, que estarían implicados en el proceso, por lo que se habla del concepto de inflamación neurogénica. La liberación de una cierta variedad de estos neuropeptidos (sustancia P, encefalinas, neurokinina A...) implica una acción sinérgica, que ha sido demostrada en diversos órganos, como la piel, tracto respiratorio, ojos, articulaciones...

Se estima que la respuesta inflamatoria neurogénica, presumiblemente forma parte de los mecanismos naturales de defensa del organismo, aunque también puede contribuir al componente lesivo inflamatorio [20]. La capsaicina, componente picante extraído de especies de la familia *Capsicum*, provoca respuestas inflamatorias, debido a la liberación de sustancia P de terminaciones nerviosas sensoriales y es posible que, en fases posteriores, también la histamina esté implicada en el mecanismo pro-inflamatorio de la capsaicina. Es posible que este agente flogístico actúe directamente sobre las células mastocíticas, provocando la liberación de histamina [77].

El sistema inmune puede provocar una RESPUESTA DE TIPO HUMORAL, generando anticuerpos (Ac) frente al antígeno (Ag) causal, o bien por la formación de anticuerpos autoinmunes. La respuesta autoinmune puede involucrar al SISTEMA DE INMUNIDAD CELULAR, con la participación de los linfocitos T, células derivadas del timo, implicando a otras células de tipo accesorio, como son macrófagos, células endoteliales células de Langerhans. Los linfocitos B, provenientes de médula ósea, son los encargados de la generación de anticuerpos.

En el proceso inmune pueden diferenciarse varias fases; en la primera, se forma el inmunocomplejo Ag-Ac (microprecipitados), que interacciona con el sistema de complemento, activándose en esta segunda etapa los factores C_{3a} y C_{5a} , que por una parte reaccionan con las células mastocíticas, liberando histamina y serotonina, y por otra, contribuyen a la quimiotaxis de leucocitos neutrófilos. En el tercer período, la fagocitosis del inmunocomplejo por los neutrófilos, produce la degranulación de los mismos y formación de fagolisosomas. Estos lisosomas liberan a su vez, por secreción o por destrucción celular, gran cantidad de enzimas proteasas ácidas, degradantes de elastina y colágeno, cininogenasas y activadoras de prostaglandinsintetasa.

Generalmente, se aceptaba que los neutrófilos se concentraban en el foco lesionado, como una última consecuencia de la inflamación, sin embargo son ellos los principales causantes de los síntomas inflamatorios, así en animales desneutrofilados no aparece la inflamación anafiláctica, ni la inducida por carragenina en el test pulmonar.

De entre los procesos inflamatorios crónicos cabe destacar, por su frecuencia e importancia, la **ARTRITIS REUMATOIDEA (AR)**. Consiste en una enfermedad autoinmune multisistémica, de carácter crónico y etiología desconocida, que produce inflamación crónica de articulaciones y afecta al 1% de la población mundial. De todas formas, aunque no se ha identificado el estímulo etiológico, ciertamente existe una actividad inmunológica persistente.

Se ha comprobado que la mayoría de los pacientes con AR portan antígenos de clase II del **Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)**, HLA-DR4, HLA-B27 y/o HLA-DR1, factores predisponentes a esta enfermedad, debido a un efecto de DR4 en la expresión de receptores de células T; así mismo, la presencia del antígeno en la madre, es capaz de provocar esta susceptibilidad en la descendencia, aunque no sea heredado [384].

En la AR concurren, por un lado, una respuesta inflamatoria de curso crónico, un proceso inmunitario, que implica a los linfocitos B en la formación de complejos Ag-Ac (factor reumatoideo), que involucra también a los linfocitos T en el desarrollo de un mecanismo de inmunidad celular; y por último, las células de los tejidos articulares, responsables de la proliferación e infiltración de macrófagos y fibroblastos sinoviales (sinoviocitos), de la resorción ósea, por aumento de la actividad osteoclástica y de la disminución de cartílago ante la invasión del pannus o tejido conjuntivo precipitado. Se observará un fluido sinovial rico en linfokinas, monokinas, complejos inmunes, RL, enzimas proteolíticas... [226], con infiltración celular de linfocitos T, predominando los T_4 o T_{helper} , sobre los T_8 o $T_{\text{citotóxicos}}$, macrófagos HLA-DR positivos y células dendríticas [179].

En el fluido articular y en el suero aparecen autoAc frente a la propia IgG, contra la región Fc (fragmento cristalizable). Es posible que esta Ig haya sido previamente modificada por RL, apareciendo con menor contenido en galactosa durante el proceso de la AR [124].

La formación de los consiguientes inmunocomplejos activa el sistema de complemento, se liberan factores quimiotácticos que atraen a los

leucocitos y éstos fagocitan los complejos Ag-Ac, con deplección de los lisosomas.

Las enzimas lisosomales dañan entonces los cartílagos y tejidos adyacentes, con lo que se incrementa el grado de inflamación.

La AR se caracteriza, por tanto, por una intensa inflamación, angiogénesis, migración de células T y B, macrófagos y neutrófilos. Los macrófagos y linfocitos activados producen eicosanoides y RL [309], los cuales poseen potente actividad pro-inflamatoria. Los linfocitos T y los macrófagos inducen la neovascularización, mediada por citokinas, IFN- γ , IL-1, TNF- α ...[179]. Las citokinas amplifican y perpetúan la inflamación articular. Las células T secretan IL-2, IL-3, IL-4 e IFN- γ , activando las respuestas inmunes celulares y humorales. Los eicosanoides, RL, citokinas y TGF- β , parecen jugar un importante papel en este cuadro patológico [75].

En el fluido sinovial, las células T presentan una mayor expresión de CD29 en las T de memoria, reduciéndose la expresión de CD45R en los T nativos, así como una expresión de LFA-1, CD11a/CD18, marcadores de membrana implicados en variedad de interacciones célula-célula, incluyendo la unión de células circulantes a vénulas postcapilares, paso previo a la infiltración [179].

Debido al incremento de permeabilidad vascular que existe, se activa el sistema kalicreína-kininógeno-kinina, que amplifica la respuesta inflamatoria, al inducir en los macrófagos la liberación de IL-1 y TNF, citokinas que pueden, a su vez, potenciar el incremento de permeabilidad capilar. La bradikinina estimula el metabolismo del AA en fibroblastos, debido a que éstos poseen receptores para la IL-1 y TNF, cuya liberación induce esta kinina [51].

Uno de los acontecimientos de mayor relevancia en la iniciación y propagación de la respuesta inflamatoria crónica, es la adherencia de leucocitos circulantes, a células endoteliales de vénulas postcapilares y la consiguiente migración hacia la membrana sinovial. La infiltración de células perpetúa la compleja cascada de eventos, que en parte es el resultado de la liberación de citokinas. Tras la activación de T_h por Ag

específicos, estas células liberan citokinas e inducen los fenómenos locales y sistémicos característicos de la AR. La repetida aparición del Ag, seguida por la evolución normal de la respuesta inmune, y producción de citokinas, podría explicar la persistencia de la inflamación reumatoidea.

Por ello, no parece exagerado considerar fundamental el papel de las citokinas, en la inflamación crónica, y más concretamente en la AR. La multiplicidad de acciones es debida, por un lado, al gran número de citokinas que han sido ya identificadas, y por otro al sinergismo/antagonismo de sus acciones.

Derivadas de linfocitos pueden citarse a la IL-2, IL-6, GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos), TNF- α y TGF- β (factor de crecimiento celular). Los macrófagos generan, de importancia fisiopatológica en la AR, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, GM-CSF, M-CSF (factor estimulador de crecimiento para macrófagos), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), IGF (factor de crecimiento insulínico), EGF (factor de crecimiento epidérmico) y TGF- β . Los fibroblastos y células endoteliales liberan IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, M-CSF y PDGF [179].

La actividad de cada citokina es determinada por la presencia de receptores, altamente ávidos, en la membrana celular, receptores que son expresados tras la activación celular. Parece precisa la activación de varias proteinkinases, mediante mecanismos de fosforilación. Una citokina puede influir en la actividad de otra, potenciando o inhibiendo su producción, así como la expresión de su receptor.

Las citokinas pueden actuar solas o con otros mediadores, potenciando la destrucción tisular en enfermedades crónicas como la AR, debido a la capacidad de IL-1 de potenciar o amplificar el componente humoral y celular de la respuesta inmune. Esta linfokina puede inducir la proliferación de varias poblaciones de linfocitos, responsables del componente inmune de la inflamación, principalmente porque provocan la inducción de IL-2 y expresión del receptor para este factor de crecimiento, receptor que es expresado por un gran número de linfocitos T [226]. La IL-2 produce activación y

proliferación de células T, y la IL-1, IL-6 y TNF- α amplifican la respuesta [179].

La IL-1, IL-6, INF- γ y TNF- α potencian la diferenciación de células B, inducida por IL-2, en el líquido sinovial. La activación de macrófagos corre a cargo de IFN- γ , GM-CSF, M-CSF e IL-2, así como la proliferación de células sinoviales es debida a la acción de IL-1, PDGF, IGF1, FGF, EGF, TGF- β .

La IL-1 y el TNF- α activan los condrocitos y osteoblastos, con la consiguiente pérdida de cartílago y matriz ósea [179]. Otras citokinas pueden modular los efectos de la IL-1 y TNF, así IFN- γ es capaz de inhibir la resorción ósea activada por IL-1 o TNF, y el efecto mitogénico de TNF en fibroblastos, en contraste, potencia la actividad antiviral de TNF y la inducción de citotoxinas de monocitos, frente a células tumorales [30].

En realidad, no son los linfocitos los que destruyen el cartílago y hueso de la articulación inflamada, sino que es a través de la activación celular y liberación de IL-1, o por la linfoxina. Sin embargo, el TNF posee menor influencia en la proliferación linfocítica y respuesta inmune [30], mientras que la angiogénesis o neovascularización es determinada por la actuación de TNF- α , FGF, EGF, TGF- β , GM-CSF y PDGF [179].

Las citokinas tienen un efecto positivo en el proceso de migración celular, porque alteran la función de los leucocitos y además, potencian la adhesión de leucocitos y migración a través de las células endoteliales de vénulas postcapilares. IL-1 y TNF- α inducen la expresión de receptores de adhesión de las células endoteliales residentes, ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular), que es el ligando de LFA-1 y ELAM-1 (molécula de adhesión endotelio-leucocitos), expresada por células endoteliales activadas por IL-1, TNF- α o LPS.

La expresión de moléculas del MHC en células endoteliales, también puede influir en la adhesión de linfocitos. TNF- α y TNF- β estimulan la expresión de moléculas de clase I del MHC, en células endoteliales y el IFN- γ induce la expresión de moléculas de clase I y II. Estas células normalmente sólo muestran la clase I, mientras que en los procesos inflamatorios, como la AR, manifiestan también la clase II, lo que

incrementa la adhesión de linfocitos T CD4 positivos [179]. El TNF- α , IL-1 e IFN- γ pueden inducir daño tisular por RL, directamente o por la activación de neutrófilos, lo que supone pérdidas en la barrera endotelial, que favorece la entrada de células al foco inflamatorio.

La permeabilidad vascular también se ve incrementada por ciertas citokinas como el TNF- α . La IL-1 e IFN- γ pueden incrementar la permeabilidad vascular por efecto indirecto, a través de aminas vasoactivas de células mastocíticas.

La IL-8, por su parte, es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos y linfocitos, que actúa a muy baja concentración, derivado de monocitos activados, fibroblastos y células endoteliales; aún no se conoce exactamente el papel que juega en la producción de RL [133] y el TGF- β es quimiotáctico para los monocitos.

Por otro lado, existen antagonistas naturales de las propias citokinas, como es el caso de IL-1ra; producido por las mismas células que liberan IL-1, monocitos y macrófagos, compite con IL-1 α e IL-1 β por la unión a su receptor, pero no induce ninguna respuesta. Curiosamente, la concentración de IL-1ra es mayor en líquido sinovial en AR que la de IL-1 [13]. Puede que las citokinas, en el fluido sinovial, favorezcan la regresión del proceso, quizá la IL-1ra previene el daño crónico articular. La PGE₂ inhibe la producción de IL-1, debido al incremento en el nivel de AMP_c. El TGF- β antagoniza los efectos de IL-1 e IL-2 en la proliferación linfocítica [179], por lo que se estima que podría actuar facilitando el proceso de curación.

La dificultad que existe para detectar las citokinas en el líquido sinovial, podría ser debida al hecho de que al tiempo que se generan citokinas, también son producidos sus inhibidores, y por otro lado, puede que las células T produzcan las citokinas, durante el curso de la enfermedad, sólo de forma intermitente.

En pacientes con AR existe una generación incrementada de especies oxidantes, que pueden ser producidas por los macrófagos activados en la membrana sinovial, ya que el aumento de presión intraarticular, posiblemente

provoca isquemias transitorias en la superficie de la membrana. Los neutrófilos generan radical superóxido, que a su vez produce peróxido de hidrógeno. Estos radicales libres contribuyen al daño tisular en la AR [125,309].

Los agentes oxidantes podrían atacar estructuras normales para crear nuevos Ag, contribuyendo así a la autoinmunidad, pues las proteínas modificadas por radicales, presumiblemente, inducen la formación de Ac [124]. Los neutrófilos liberan superóxido y peróxido de hidrógeno, provocando daño a la IgG, lo que puede explicar la presencia del factor reumatoideo. Provocan también daño al cartílago y proteínas ricas en prolina, como el colágeno [32].

El *pannus* es rico en macrófagos, y éstos y otros fagocitos se adhieren a la superficie del cartílago, existiendo una importante bajada de pH que favorece la formación de peróxidos y superóxido, se libera hierro proteico y se forma radical hidroxilo [124]. El alto contenido en macrófagos de la membrana sinovial implica la generación de IL-1, que estimula a los sinoviocitos y condrocitos para liberar enzimas proteolíticos y promover la resorción ósea. La presencia adicional de especies oxidantes en el medio, facilita la degradación del cartílago por proteasas endógenas [309].

El fluido sinovial presenta una viscosidad por debajo de lo normal, ya que el ácido hialurónico es anormal, con cadenas de menor longitud, que puede ser fácil diana de la degradación por RL. También se observan niveles incrementados de dienos conjugados, lo que sugiere una peroxidación lipídica aumentada. Los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno, generados por fagocitos en el foco articular inflamado, no pueden ser controlados por las enzimas naturales protectoras, ya que tan sólo se observan trazas de actividad de la SOD (superóxidodismutasa) y poca o ninguna actividad catalasa y glutathionperoxidasa [124]. La concentración de ascorbato también se ve disminuida, con toda probabilidad porque es rápidamente oxidado a dehidroascorbato, por el superóxido que liberan los neutrófilos activados.

En la AR hay una caída del hierro total, lo que implica una baja disponibilidad para catalizar reacciones que liberen radicales libres; por

ello, las terapias en las que se administra hierro para contrarrestar la frecuente anemia de pacientes con AR, más que beneficiar, pueden conducir a la estimulación de reacciones en que se libera radical hidroxilo y la peroxidación lipídica, con lo que el daño sería mayor [124].

Las prostaglandinas poseen una curiosa actividad en la inflamación crónica. Por un lado, provocan en condrocitos la descarga de proteinasas, colagenasas y factor activador del plasminógeno, con activación de osteoclastos; por otro, parecen modular/inhibir la actividad de los linfocitos.

Los macrófagos liberan IL-1 (linfokina activadora de linfocitos T) e IL-2 (factor de crecimiento de células T) y estas interleukinas inducen en los macrófagos la generación y liberación de PGE_2 y quizá PGI_2 . Las PG de la serie E, a su vez, estimulan la acumulación de AMP_c [22], por la activación de la adenilatociclasa. El AMP_c intracelular acumulado inhibe la descarga lisosomal de los neutrófilos, por lo que la consecuencia es que las PG modulan la actividad de los neutrófilos, así como la proliferación de células T, generación de linfokinas y citotoxicidad mediada por linfocitos T. Si los macrófagos liberan PG y éstas modulan la función linfocítica, esto sugiere un mecanismo de regulación, destinado a mantener un balance entre la activación de linfocitos por las linfokinas liberadas por macrófagos y la inactivación linfocítica mediada por PG [177].

La PGI_2 reduce la proliferación linfocítica y se supone también un cierto papel modulador, como el de PGE_2 , sobre la función de los linfocitos T. La PGD_2 y PGA_2 , manifiestan menor potencia inhibidora de linfocitos que PGE_2 y PGE_1 . La PGE_2 también posee funciones inhibidoras sobre los linfocitos B, aunque éstos son anormalmente resistentes a esta influencia en la mayoría de los casos de AR. Sin embargo, el TXA_2 puede estimular la función linfocítica.

A esta actividad de las PG, se suma la interacción con otros mediadores de la inflamación, hecho de relevancia en la AR [22].

Mientras que los productos derivados del AA por la vía de la CO, parecen inhibir la función leucocitaria, por aumento de los niveles de

AMP_c, los leucotrienos, productos de la ruta de la LO, potencian la actividad linfocítica, posiblemente por incrementar los niveles intracelulares de GMP_c [168]. La liberación de enzimas lisosomales de los neutrófilos se asocia a un concomitante aumento del nivel de GMP_c. El LTB₄ activa macrófagos y es un potente quimiotáctico que provoca la agregación de neutrófilos, así como un incremento de los niveles de IL-1, linfokina intrínsecamente relacionada con la respuesta inmune [328].

En el fluido sinovial puede observarse un aumento marcado de anafilotoxinas y eicosanoides, PGE₂, TX, 5-HETE y un apreciable nivel de LTB₄ [135]. El origen de estos eicosanoides está en los macrófagos y neutrófilos, que infiltran la sinovial y sinoviocitos. Como ya se ha indicado, las lipoxinas parecen jugar un papel modulador en reacciones inmunológicas por inhibir la formación del LTB₄, afectando a los receptores de LT [67].

Llegados a este punto, es difícil comprender en qué grado los eicosanoides, aniones superóxido y radicales hidroxilo, participan en la patogenia de la lesión, o se están comportando como moduladores y favorecedores de la reparación tisular [118]. Para algunos autores, la PGE₂ es responsable de la resorción ósea por activación de los osteoclastos, producción de collagenasa por parte de macrófagos y liberación de diversas linfokinas por linfocitos T, pero para otros desempeña un papel moderador o regulador de los linfocitos y sus linfokinas, a través de la activación de la adenilatociclasa y producción de AMP_c [177]. En cambio, los endoperóxidos cíclicos, los radicales superóxido [125], el TXA₂, LTB₄ y 5-HETE, contribuyen a los procesos destructivos y a la atracción quimiotáctica de nuevos elementos.

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ANTIINFLAMATORIAS

La frecuencia y gravedad de la sintomatología inflamatoria y el hecho de que este sistema de defensa del organismo no sea siempre autocontrolable, obliga al empleo de agentes terapéuticos que traten de paliar las consecuencias negativas de estos procesos, así como restituir los focos lesionados.

Los fármacos antiinflamatorios intentan bloquear o frenar la producción y actividad de células y mediadores, involucrados en la respuesta inflamatoria, ya que la implicación de reacciones autoinmunes impide, en muchas ocasiones, eliminar la verdadera causa del estado patológico, puesto que, frecuentemente, esta etiología es desconocida.

La complejidad del proceso patológico, hace evidente que no pueden frenarse estas respuestas mediante un mecanismo sencillo o la inhibición exclusiva de alguno de los mediadores de la inflamación. Se dispone, no obstante, de un extenso arsenal terapéutico, potencialmente ampliable, gracias a los increíbles avances que está experimentando el conocimiento de la bioquímica de la respuesta inflamatoria.

El grupo farmacológico de elección en los procesos inflamatorios, lo constituyen los glucocorticoides, inhibidores de la enzima PLA_2 , que disminuyen, por tanto, la formación de todos y cada uno de los distintos prostanoïdes, PG, PGI_2 , TX, LT, HETE y lipoxinas. Actúan indirectamente, liberando una proteína inhibidora de dicha enzima, la lipocortina. También se ve disminuida la formación de PAF y la generación del potente agente pro-inflamatorio IL-1. Sin embargo, su empleo es relativamente restringido, ya que se manifiestan graves efectos secundarios, por lo que su uso se reduce a los casos estrictamente necesarios.

Una posibilidad de ampliar este campo, podría ser la búsqueda de compuestos que mimetizen la acción de la lipocortina, concretamente el fragmento activo de la misma, que ya ha sido identificado [61].

Sin duda, el grupo terapéutico más frecuentemente utilizado son los AINES (antiinflamatorios no esteroïdicos). La hipótesis más extendida indica

que la acción básica que explica los efectos farmacológicos de los AINES, radica en la inhibición de la actividad de la CO, mecanismo de acción descrito, ya en 1971, por Vane y colaboradores. Estos compuestos inhiben la síntesis de prostaglandinas, reduciendo así la respuesta inflamatoria [97,349]. Estas drogas inhiben también otras enzimas e interfieren con otros sistemas celulares, aunque generalmente se requieren concentraciones superiores, lo que podría contribuir a los efectos tóxicos de estos fármacos, sobre todo en el caso de intoxicación por sobredosis.

De todas formas, existe cierta controversia con respecto a este mecanismo de acción, y aunque aún no ha sido desbancado, se pueden postular otros que justifiquen los efectos farmacológicos de los diferentes AINES, entre los que cabe destacar las acciones sobre la oxidación celular, el movimiento de calcio no mitocondrial, la activación de la actina F y de la proteinkinasa C, oposición al proceso estímulo-respuesta relacionado con los neutrófilos, impidiendo la adhesión de los mismos, interferencia en las señales que dependen de las proteínas G para la transducción a través de las membranas celulares... [14,348,376].

Independientemente de estos hechos, es importante considerar que la inhibición exclusivamente de la ruta de la CO, deja al descubierto un importante aspecto de la inflamación, la actividad de los productos derivados de la vía de la LO.

La inhibición de la enzima LO supondría la anulación de los importantísimos efectos pro-inflamatorios de los LT, y con esta actividad se conocen al ácido nordihidroguaiarético, fenidona, benoxaprofeno [36] y propilgalato [124].

Por otro lado, lo más deseable sería la inhibición de ambas rutas metabólicas del AA, mediante lo que se conoce como inhibidores duales de CO y LO [348]. El enorme potencial terapéutico de estos agentes depende, claramente, del relevante papel que las PG, PGI₂, TX y LT desempeñan en la respuesta inflamatoria, contribuyendo a su instauración y permanencia.

Estos inhibidores duales presentan propiedades similares a los corticosteroides, que reducen la síntesis de PG y LT al prevenir la

liberación del AA, pero exentos de los efectos tóxicos de los mismos [139]. Dentro de estos agentes, se puede considerar como uno de los pioneros en este campo, al denominado BW755C [139,140], compuesto que ha despertado un gran interés.

Por otro lado, la alteración del nivel de ácidos grasos esenciales en la dieta, constituye una curiosa estrategia terapéutica, en la que el ácido eicosapentanoico, de los aceites de pescado -de gran riqueza en estos ácidos grasos esenciales-, actúa de sustrato de la CO y LO, para formar PG de la serie 3 y LT de la serie 5.

La potencia de los análogos pentaenoicos, LTB₅, en la agregación de PMN es tan sólo de un 10% con respecto a la del LTB₄ [22], sugiriendo que una dieta enriquecida en aceite de pescado podría tener un efecto beneficioso en enfermos de AR y otros procesos patológicos, en los que los derivados eicosanoides desempeñan un papel relevante [16,133]. Estudios realizados en humanos voluntarios y pacientes reumáticos, demuestran esta hipótesis, aunque paradójicamente, la quimiotaxis de neutrófilos se restaura a las 6 semanas de la instauración del tratamiento con cápsulas de aceite de pescado [16].

La suplementación de la dieta con ácido dihomo- γ -linoleico supone una inhibición competitiva de la serie 2 de las PG y 4 de los LT, por lo que se suprimiría, al menos parcialmente, la respuesta inflamatoria, disminuyendo la liberación de eicosanoides por macrófagos y la respuesta quimiotáctica de PMN [22].

El concurso de múltiples mediadores en el proceso inflamatorio abre la posibilidad de ser considerada positiva la actuación sobre cualquiera de ellos, como por ejemplo inhibir las acciones de las aminas vasoactivas; sin embargo, las drogas más usadas como antiinflamatorios, poco efecto tienen sobre la liberación o actividad de histamina, serotonina o enzimas lisosomales, de igual forma que los antagonistas de serotonina o histamina poseen poco o ningún efecto, sobre la inflamación propiamente dicha.

Podría influir el curso clínico de la enfermedad la administración de IL-1ra u otros inhibidores de citokinas en el espacio articular [13].

La administración de PGE_2 inhibe el desarrollo de artritis experimental en ratas, postulando como posible mecanismo de acción, la inhibición de la función linfocítica que presenta este prostanoide, impidiendo la generación de IL-1 [177], aunque se ha observado que las células B son anormalmente resistentes a la influencia inhibidora de la PGE_2 [8].

La proliferación linfocítica inducida por IL-1 e IL-2 es antagonizada por la citokina TGF- β , aunque aún no está establecido si, en el proceso de AR, los linfocitos presentan una sensibilidad disminuida a la influencia inmunomoduladora de esta citokina [179].

La clara implicación de las especies oxidantes en la patogénesis de los procesos inflamatorios, amplía en gran medida la actuación terapéutica, que podría orientarse hacia la **captación de radicales libres**, quelación de metales catalíticos o administración y terapias de suplementación de la dieta con antioxidantes [124,309]. De hecho, ciertos tratamientos con 'scavengers' o captadores de radicales libres, en modelos experimentales de inflamación local (Reacción de Arthus) parecen revertir el proceso patológico [124].

El ácido ascórbico inhibe el edema inducido por carragenina en ratones, cuando es administrado después de provocar la reacción inflamatoria [310].

Se ha observado que la inflamación experimental inducida por xantinoxidasa puede ser revertida por la administración de SOD. Aunque existen muy pocos datos, con respecto al tratamiento de enfermedades autoinmunes en humanos, con 'scavengers' o con agentes quelantes, puede hacerse referencia a tratamientos con SOD encapsulada en liposomas en la enfermedad de Crohn's o dosis elevadas de vitamina E, en casos de lupus eritematoso. La inyección de SOD en las rodillas de pacientes reumáticos posee efecto beneficioso, lo que demuestra la importancia de los RL en estos procesos [124].

El tratamiento con desferrioxamina agrava la fase aguda de la inflamación, pero disminuye la crónica, por quelación del hierro, aunque

esta posibilidad de acción terapéutica aún está en fase de investigación [124].

Una suplementación de la dieta con antioxidantes parece disminuir las manifestaciones de ciertas enfermedades crónicas en ratones, constatándose una vida media más larga.

Muchos de los agentes antiinflamatorios conocidos pueden actuar en parte como 'scavengers', ya que su estructura química es oxidable [137], haciéndoles ávidos por el radical hidroxilo [124]. Actualmente, se están desarrollando complejos de cobre de AINES, con actividad sobre el metabolismo oxidativo de PMN, incrementando así su efectividad antiinflamatoria [258].

Por otro lado, la inhibición de la ruta de la CO o de la LO significa que se reduce una de las fuentes de RL. También existen algunos antioxidantes, como NDGA y propilgalato, que son inhibidores de LO [124].

Como ya se ha indicado, ciertas células -fagocitos, neutrófilos- liberan RL, por lo que el tratamiento con agentes inmunosupresores, por ejemplo penicilamina o metotrexato, que disminuyan la actividad de estas células, implica una menor generación de estas especies oxidantes [124].

Existen mecanismos neurogénicos y liberación de ciertos neuropéptidos, que pueden contribuir en los procesos inflamatorios de desarrollo crónico, por lo que la inhibición del componente neurogénico, mediante el bloqueo de los receptores de dichos péptidos pro-inflamatorios, liberados de nervios sensoriales, o el bloqueo de la activación nerviosa por agentes terapéuticos, podría tener un efecto beneficioso en enfermedades inflamatorias como la artritis, en la que existe un componente denominado inflamación neurogénica [20].

Las intervenciones inmunológicas para el tratamiento de la enfermedad reumática representan, hoy día, una de las promesas más interesantes en el control del proceso inflamatorio crónico, fundamentalmente en enfermedades de origen autoinmune.

Existen distintos agentes con actividad sobre la función linfocítica, por ejemplo la D-penicilamina suprime la proliferación linfocítica; los compuestos de oro poseen efecto citotóxico sobre macrófagos; la inmunidad humoral y celular se ve afectada en los tratamientos con metotrexato; antimaláricos, como la hidroxicloroquina, disminuyen la degradación del cartílago inducida por IL-1, etc.

Pero no sólo pueden emplearse fármacos supresores de algún aspecto de la función inmunitaria, existen también agentes biológicos, como los anticuerpos monoclonales, líneas de células T atenuadas e incluso ciertas linfokinas, como el IFN- γ , cuya producción es deficiente en pacientes con AR, comprobando que su administración podría reducir el daño en articulaciones inflamadas [226].

MATERIAL Y MÉTODOS

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *Teucrium buxifolium*

La especie *Teucrium buxifolium* goza de fama en la región levantina de la Península Ibérica, por su gran poder paliativo de las afecciones reumáticas y todo tipo de inflamaciones, recolectada en flor y usada en forma de tisana.

Este empleo tradicional, así como la revisión bibliográfica realizada sobre los usos de otras especies afines y su confirmación a nivel científico, así como la prometedora composición fitoquímica del género y más concretamente de la especie, impulsan al estudio farmacológico de su actividad antiinflamatoria, que en caso de corroborarse, permitiría justificar su empleo popular.

INDUCCIÓN DE ARTRITIS GENERALIZADA

La artritis reumatoidea posee un componente inmunitario innegable, por lo que los modelos experimentales, que intentan reproducir este cuadro patológico, suelen emplear métodos de desarrollo inmune.

Si se acepta que la AR es un proceso fisiopatológico, que surge como consecuencia de reacciones inmunes locales y/o sistémicas, provocadas por un Ag, hasta el momento de naturaleza desconocida, la reproducción experimental de los mecanismos celulares y humorales que median la inflamación y el daño tisular, sería la base de los métodos de estudio de AR [69].

Bases Patogénicas: fase aguda y crónica

El modelo elegido para la inducción de artritis experimental en animales de laboratorio, ha sido el descrito por Mizushima en 1972 [209], que combina la típica artritis por adyuvante, descrita por Pearson años atrás [240], con la inflamación de tipo agudo inducida por carragenina, agente flogístico introducido en la práctica experimental por Winter [383].

Como ya se ha indicado, es difícil reproducir en el laboratorio la AR ya que es una patogenia compleja. Al exponer a animales sanos a una noxa, se produce una inflamación primaria, en respuesta a este agente lesivo, que generalmente es localizada y de tipo agudo, mientras que la inflamación secundaria afecta a la reactividad general del organismo [299].

La artritis inducida por adyuvante de Freund es el mejor modelo experimental para la reproducción de dichas lesiones secundarias [299], y algunos animales desarrollan inflamación de extremidades [377], pero la aparición de estas lesiones requiere un prolongado período de tiempo, con máxima inflamación a los tres días y desarrollo de lesiones en articulaciones, a los 13-30 días [217].

Por otro lado, se requieren dosis muy elevadas, incluso tóxicas, de fármacos para la inhibición de este proceso. Por ello, la combinación del edema agudo inducido por carragenina y artritis generalizada por adyuvante, constituye un modelo de grandes ventajas, ya que la experiencia puede llegar a completarse en tan sólo 10-11 días y se reducen, considerablemente, las dosis empleadas, lo que supone un menor condicionamiento del estudio cuando el producto a ensayar es escaso [209].

El proceso se desarrolla en dos fases, una fase aguda de similares características al edema inducido por el agente irritante carragenina y una fase crónica, con manifestación de lesiones secundarias, que corresponde a la artritis generalizada inducida por el adyuvante, previamente inoculado.

La intensidad del edema es equivalente a la que provocaría la carragenina por si sola, al menos durante las tres primeras horas, pero posteriormente se prolonga el desarrollo del proceso, incrementándose

durante los días 1 a 3, después de la administración del agente flogístico [209].

Por otro lado, aún cuando el proceso inflamatorio lleva consigo un importante componente doloroso, la artritis por adyuvante no es un buen modelo para el estudio de fármacos con potencial analgésico [210], aunque es el mejor método para el estudio de fármacos antiinflamatorios [299], como ya se ha indicado.

Fase Aguda

La fase aguda de la inflamación corresponde, en este modelo experimental, a la acción de la carragenina, agente flogógeno que ofrece la ventaja de provocar un estímulo local sin efectos sistémicos, además de una gran reproductibilidad [383].

Se asume que el edema provocado en este modelo experimental, presenta características similares al que ocasionaría la carragenina por sí sola, aunque la duración del proceso no coincida [209]; por ello, en la patogenia de la fase aguda de la artritis experimental se detalla, como tal, el edema por carragenina.

La fuente natural de obtención de la carragenina es un alga Rodofícea, concretamente el musgo de Irlanda o liquen de Islandia, *Chondrus crispus* [383], aislándose un heteropolisacárido de similares características, de otras algas marinas, como *Gigartina stellata*, *G. pistillata*, *Hypnea musciformis*, *Rhodymenia palmata*...[263].

La carragenina posee una estructura y composición de mucopolisacárido sulfatado, que se separa en dos fracciones por la acción del cloruro potásico; una de ellas gelifica por la acción del ión K^+ , por lo que se denomina κ -carragenina, mientras que la otra es insensible al potasio y se conoce como λ -carragenina, representando el 40 y 60% del extracto, respectivamente [263].

La λ -carragenina, constituida por sulfato de D-galactosa, es más irritante, así como más activa a la hora de provocar inflamación aguda o crónica, o bien como agente anticoagulante, de igual forma que presenta una mayor toxicidad.

Este agente, administrado en animales de experimentación por vía subcutánea, se absorbe con dificultad, hecho que justifica su poder edematógeno [263], edema que parece desarrollarse en varias etapas, con una fase temprana y una tardía, que es dosis-dependiente [82].

En la etapa inicial, desde tiempo cero hasta los 90 min., existe una liberación simultánea de histamina y serotonina, ejerciendo ambos mediadores su efecto máximo sobre la permeabilidad vascular [264]. En la siguiente fase, de los 90 a los 150 min., los mediadores implicados en el mantenimiento de la inflamación son las kininas, fundamentalmente la bradikina [52]; mientras que la etapa final, hasta las 6 horas, con máxima respuesta vascular a las 4 horas, está protagonizada por las PG [264,369], SRS [263] y LT, sospechándose una implicación de los RL al final del proceso.

Todos estos mediadores parecen ser dependientes del sistema del complemento, para su activación y liberación [265], por lo que durante todo el proceso, el complemento juega un importante papel. La carragenina promueve la formación de kinina por activación de la plasmina, ya que activa el factor de Hageman [264] y, a su vez, la bradikina incrementa la síntesis de PG [52].

A lo largo del proceso, existe también liberación de algunas enzimas lisosómicas, implicadas en la patogenia del mismo, como la β -glucuronidasa.

La liberación de PG está asociada con un fenómeno de migración leucocitaria, y la mayoría de los AINE actúan en la última fase del proceso, la etapa dependiente de los metabolitos de la CO, existiendo una relación entre la inhibición de esta fase y su capacidad para suprimir la migración leucocitaria en los tejidos inflamados; por ello, la supresión del edema, desde las dos horas y media, hasta las seis horas después de la inyección de carragenina, constituye un índice del descenso de la migración leucocitaria [265].

En la 2ª hora comienza la migración celular, mientras que el exudado celular se desarrolla en la 4ª hora, con un 70% de PMN y 30% de mononucleares, algunos fibroblastos y macrófagos [263].

Por otro lado, la carragenina induce un stress nociceptivo debido a la inflamación, que según parece provoca cambios en los receptores muscarínicos centrales, de forma que los m_1 manifiestan un efecto modulador pro-inflamatorio y los m_2 modulan la actividad colinérgica central y limitan la inflamación [27].

Fase Crónica

El proceso patogénico por adyuvante tiene similitud con la AR, en cuanto a la participación de células T en las lesiones locales [35], así como en la aparición de epítomos artriogénicos. Se induce la expresión de Ag de clase II en células sinoviales con infiltración de células T $CD4^+$ [157].

La relación linfocitos/PMN es igual a la unidad en humanos, mientras que en la rata es mucho mayor que uno; ahora bien, en el desarrollo de la artritis experimental, esta relación se distorsiona, acercándose a la unidad, por el claro predominio de los granulocitos circulantes [377].

Sin embargo, no parece existir respuesta humoral, como formación del factor reumatoideo, no observándose células B o células plasmáticas en el tejido inflamado [157].

Así mismo, se observa en diversos tejidos -hígado, membrana sinovial, sangre- un incremento en los niveles de peroxidación lipídica, que refleja el stress oxidativo que acompaña al proceso inflamatorio [377].

Protocolo Experimental

Con el fin de evaluar la actividad antiinflamatoria, tanto en fase aguda como crónica, de la especie objeto de estudio de esta Memoria, se ha seguido el desarrollo experimental de artritis inducida por adyuvante completo de Freund y carragenina, descrito por Mizushima [209].

En estudios preliminares, incluidos en una de las principales líneas de investigación de este Departamento, y bajo la dirección del Prof. Dr. Angel M^a Villar del Fresno, se realizó un ensayo de actividad antiinflamatoria de la especie *Teucrium buxifolium*, entre otras. Dicha especie demostró una potente actividad inhibidora del proceso inflamatorio [9], por lo que se hacía necesario profundizar en su estudio.

Se llevaron a cabo los ensayos precisos, para corroborar la actividad de los dos extractos orgánicos de *Teucrium buxifolium* más prometedores: el extracto hexánico y el extracto metanólico. De igual forma, se estudió la actividad antiinflamatoria de la infusión de esta especie, por ser ésta la forma medicamentosa de uso popular. El fármaco patrón de referencia fue la fenilbutazona, AINE de reconocido prestigio.

Como reactivo biológico, el animal de experimentación empleado han sido ratas hembra de raza Wistar, con un peso homogéneo de $175 \pm 25\text{g}$. Se eligen del citado sexo, por presentar una menor ganancia de peso de los individuos con respecto al tiempo, que en el caso de los animales macho, hecho éste muy ventajoso, teniendo en cuenta el escaso material disponible, para la realización de los ensayos biológicos.

Los animales, una vez pesados, se distribuyen de forma aleatoria en grupos de 6 individuos, manteniéndolos en jaulas de polietileno con lecho de serrín, en condiciones de estabulación convencional, a temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, dieta standard de mantenimiento (PANLAB) y agua corriente de la red. Se mantienen los animales bajo estos parámetros, al menos durante los 2-3 días previos a los ensayos, con el fin de evitar la posible influencia de alguno de los factores de variabilidad, frecuentemente descritos por diversos autores [119,374].

La experiencia consta de 11 días y comienza con la inoculación intradérmica, en la parte basal de la cola de los animales, de 0.1mL del adyuvante completo de Freund (SIGMA), conteniendo este volumen, 0.1mg de *Mycobacterium tuberculosis*, desecados y muertos al calor.

Tras un período de 6 días se comienzan los tratamientos, que serán administrados, cada 24 horas, los días 7 al 10 del ensayo. El fármaco patrón se administra a la dosis de 80mg/Kg. Los extractos orgánicos y el liofilizado de la infusión se administran a dosis equivalentes a 12.5g de planta seca/Kg de peso de animal [364], calculadas a partir de los rendimientos obtenidos en los procesos de extracción (Tabla II).

D O S I S P R O B L E M A		
EXTRACTO	RENDIMIENTO	DOSIS
Extracto hexánico	2.85 %	356.25 mg/Kg
Extracto metanólico	12.86 %	1607.50 mg/Kg
Liofilizado de la infusión	12.10 %	1512.50 mg/Kg

Tabla II. Rendimientos de los extractos orgánicos (hexánico y metanólico) y del liofilizado de la infusión de la especie *Teucrium buxifolium*, expresados en porcentaje, y dosis equivalente a 12.5g planta seca/Kg peso animal, calculadas a partir de los rendimientos obtenidos.

Todos los tratamientos, incluido el patrón, son vehiculizados en la proporción de 1mL/100g de peso de animal, realizando la administración por vía oral, mediante el uso de sonda esofágica.

Para el desarrollo de la experiencia se establecen los siguientes lotes de administración:

1.- Lote control, que no recibe tratamiento, tan sólo el vehículo en que han sido disueltos, o bien suspendidos según el caso, los distintos tratamientos. Dicho vehículo está formado por una solución, a partes iguales, de carboximetilcelulosa (CMC) al 1% (p/v) y tween 80:agua en la proporción (0.2:3.3) (v/v).

2.- Lote patrón, al que se administra el fármaco antiinflamatorio de referencia, fenilbutazona, a la dosis de 80mg/Kg, en el vehículo citado.

3.- Lote problema que servirá para ensayar la actividad del extracto hexánico, suspendido en el vehículo mencionado, y a la dosis referida.

4.- Lote problema que recibe el extracto metanólico, disuelto en la solución de CMC y tween, a la dosis correspondiente.

El liofilizado de la infusión se regenera con agua, por lo que el vehículo empleado no coincide con el que disuelve los extractos orgánicos de la planta; por ello, se realizan ensayos paralelos en los que se disponen los siguientes lotes:

1'.- Lote control al que se administra agua corriente, que constituye el vehículo de los tratamientos referidos a continuación.

2'.- Lote patrón que recibe fenilbutazona a la dosis de 80mg/Kg, disuelta en agua de la red.

3'.- Lote problema utilizado para el estudio de la actividad antiinflamatoria del liofilizado de la infusión, regenerado en agua y a la dosis a que se hace referencia.

El 7º día de la experiencia, una hora después de la administración de los correspondientes tratamientos, se inyecta a todos y cada uno de los animales, 0.1mL de una suspensión de λ -carragenina al 2% en suero fisiológico, por vía subcutánea, en la aponeurosis de la región subplantar de la pata izquierda.

La actividad antiinflamatoria se evalúa por medidas del volumen plantar en pletismómetro de agua (LETICA), realizando dichas medidas

inmediatamente antes de la inyección del agente flogógeno y posteriormente a las 3, 5, 24, 48, 72 y 96 horas. El pletismómetro se fundamenta en el conocido Principio de Arquímedes, ya que para realizar estas medidas de volumen, se introduce la pata del animal hasta el maleolo lateral [217], en el pocillo del pletismómetro destinado a tal efecto, que contiene una solución al 1% de ClNa. La pata del animal desplaza la solución salina contenida en la cubeta, a través de un vaso comunicante, tomando contacto con un electrodo y provocando así un impulso eléctrico, que es transmitido por dicho electrodo y transformado en un valor digital. El pletismómetro se estabiliza mediante una tara de polietileno, que desaloja un volumen constante de valores comprendidos entre 2.98 y 3.02, realizando el calibrado del aparato en cada medida.

La diferencia entre el volumen basal, previo a la administración de carragenina, y las medidas realizadas a las distintas horas, proporciona los incrementos de volumen, con los que se calculan los porcentajes de inhibición del proceso inflamatorio, mediante la siguiente fórmula [217]:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta V_c - \Delta V_p}{\Delta V_c} * 100$$

ΔV_c : media aritmética de los incrementos de volumen del lote control

ΔV_p : media aritmética de los incrementos de volumen del lote problema o patrón

Los lotes 1 y 1' servirán de referencia, permitiendo conocer el desarrollo del proceso inflamatorio, así como la posible influencia de los vehículos empleados. Puede calcularse también, por comparación con los lotes 2 y 2', el porcentaje de actividad de los extractos orgánicos, así como de la infusión de *Teucrium buxifolium*, con respecto a la actividad del patrón, considerada ésta como el 100%. Se realiza el análisis estadístico de los datos mediante la 't de Student', calculando la media y error standard de los incrementos de volumen, para cada uno de los lotes y el grado de significación estadística, entre los grupos tratados y el control. La comparación entre varios lotes se realiza mediante el test estadístico multidimensional de 'Newman-Keuls'.

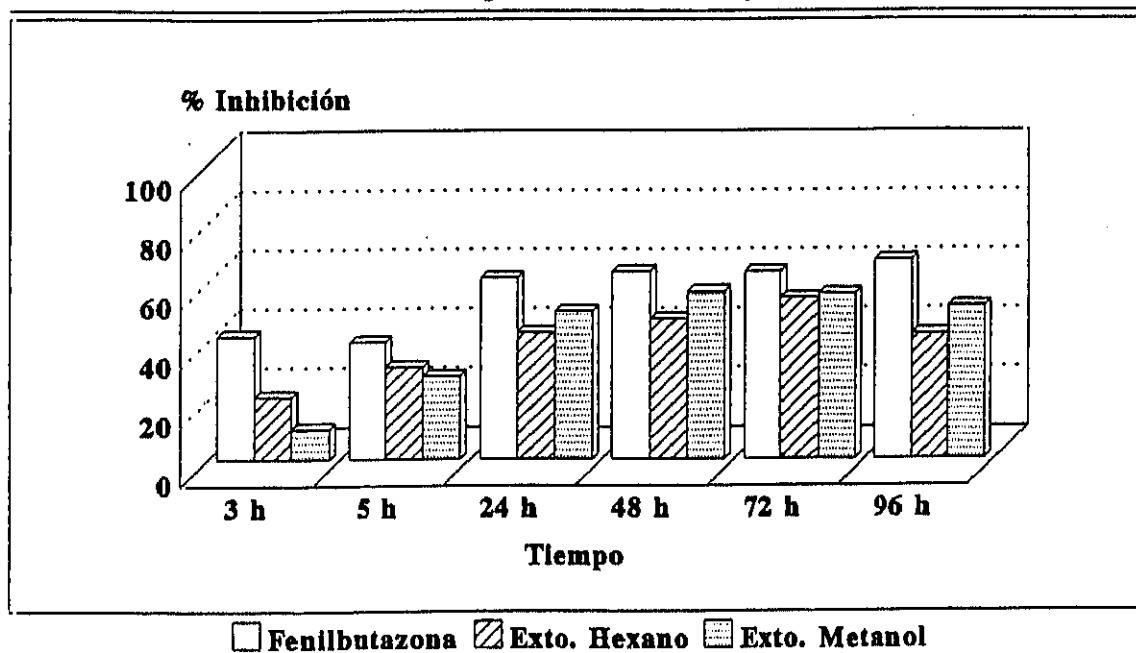
Resultados

En las siguientes tablas (Tablas III y IV) se expresa para cada lote, el valor de la media aritmética \pm error standard de los incrementos de volumen correspondientes ($\Delta V \pm ES$), el porcentaje de inhibición del proceso inflamatorio (% Inhibición) con respecto al lote control, y la actividad frente al patrón, respectivamente. En las gráficas 1 y 2 se reflejan los porcentajes de inhibición del proceso inflamatorio.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE A LA ARTRITIS GENERALIZADA						
$\Delta V \pm ES$						
Lote	3 h	5 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	1.37 \pm 0.03	1.29 \pm 0.05	0.98 \pm 0.04	0.76 \pm 0.05	0.68 \pm 0.02	0.64 \pm 0.02
Fenilbut.	0.80 \pm 0.02	0.78 \pm 0.02	0.38 \pm 0.04	0.28 \pm 0.02	0.22 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02
E. hexano	1.08 \pm 0.08	0.89 \pm 0.06	0.56 \pm 0.02	0.40 \pm 0.04	0.31 \pm 0.03	0.37 \pm 0.02
E. metanol	1.23 \pm 0.03*	0.93 \pm 0.05	0.49 \pm 0.05	0.33 \pm 0.06	0.30 \pm 0.03	0.31 \pm 0.04
% INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN						
Lote	3 h	5 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	---	---	---	---	---	---
Fenilbut.	41.61 %	39.53 %	61.22 %	63.16 %	63.16 %	67.19 %
E. hexano	21.17 %	31.01 %	42.83 %	47.37 %	54.41 %	42.19 %
E. metanol	10.22 %	27.91 %	50.00 %	56.58 %	55.88 %	51.56 %
% ACTIVIDAD RESPECTO AL PATRÓN						
Lote	3 h	5 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	---	---	---	---	---	---
Fenilbut.	100.00 %	100.00 %	100.00 %	100.00 %	100.00 %	100.00 %
E. hexano	50.88 %	78.45 %	69.96 %	75.00 %	86.15 %	62.79 %
E. metanol	24.56 %	70.60 %	81.67 %	89.58 %	88.47 %	76.74 %

Tabla III. Actividad antiinflamatoria de los extractos hexánico y metanólico de *Teucrium buxifolium*, frente a la artritis inducida por adyuvante de Freund y carragenina. $p < 0.01$
* $p < 0.05$ vs. control.

ARTRITIS GENERALIZADA
INHIBICIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO
Extractos orgánicos de *Tournefortia buxifolia*

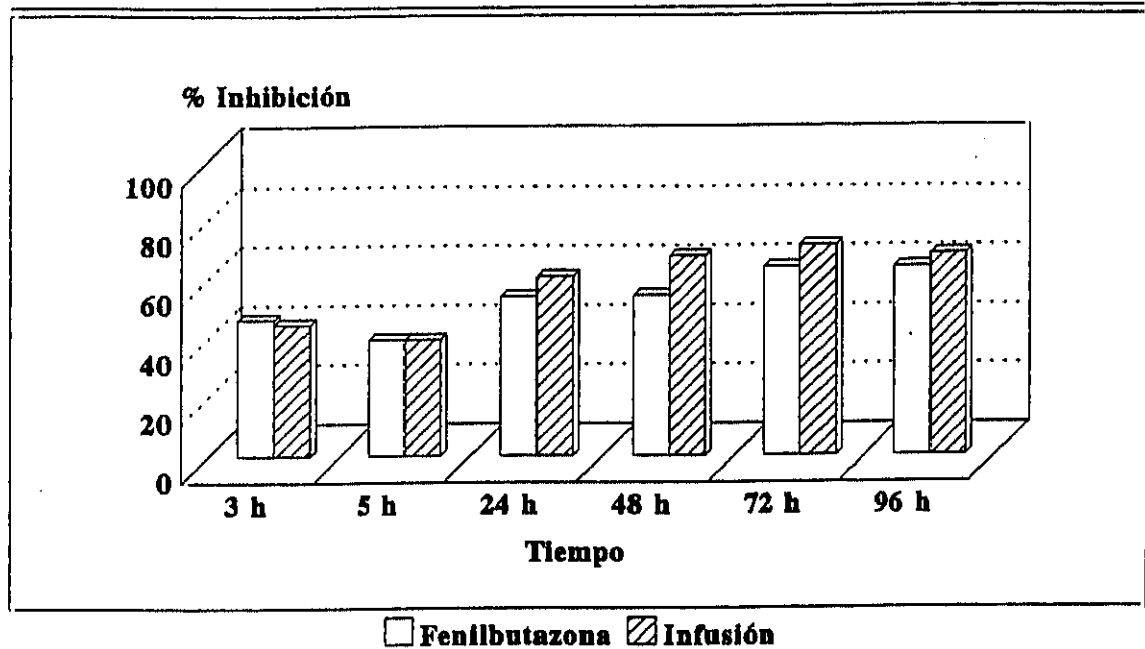


Gráfica 1.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE A LA ARTRITIS GENERALIZADA						
AV ± ES						
Lote	3 h	5 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	1.62±0.08	1.37±0.09	1.02±0.03	0.74±0.03	0.72±0.04	0.66±0.01
Fenilbut.	0.87±0.02	0.83±0.01	0.47±0.06	0.34±0.03	0.27±0.04	0.24±0.02
Infusión	0.90±0.02	0.83±0.02	0.40±0.02	0.24±0.02	0.21±0.02	0.21±0.01
% INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN						
Lote	3 h	5 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	---	---	---	---	---	---
Fenilbut.	46.30 %	39.42 %	53.92 %	54.05 %	63.50 %	63.64 %
Infusión	44.44 %	39.42 %	60.78 %	67.57 %	70.83 %	68.18 %
% ACTIVIDAD RESPECTO AL PATRÓN						
Lote	3 h	5 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	---	---	---	---	---	---
Fenilbut.	100.00 %	100.00 %	100.00 %	100.00 %	100.00 %	100.00 %
Infusión	95.98 %	100.00 %	112.72 %	125.01 %	111.54 %	107.13 %

Tabla IV. Actividad antiinflamatoria del liofilizado de la infusión de *Teucrium buxifolium*, frente a la artritis inducida por adyuvante de Freund y carragenina, $p < 0.01$ vs. control.

ARTRITIS GENERALIZADA
INHIBICIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO
 Liofilizado de la infusión de *Teucrium buxifolium*



Gráfica 2.

En el protocolo experimental de artritis inducida [209], los resultados obtenidos permiten deducir, en primer lugar, que los vehículos empleados no parecen ejercer influencia alguna sobre el curso de la artritis experimental inducida, ya que los incrementos de volumen cuantificados para los animales de los lotes control, 1 y 1', que no reciben tratamiento alguno, sólo los vehículos, son equiparables entre sí, a todos los tiempos ensayados.

De igual forma, la inhibición del proceso inflamatorio que manifiesta el patrón, no varía con respecto al vehículo utilizado. Dicho patrón, fenilbutazona, demostró su potencia antiinflamatoria a lo largo de la experiencia, exhibiendo porcentajes de actividad notables, aproximadamente del 60 %, a partir de las 24 horas.

En los ensayos anteriores realizados sobre la actividad antiinflamatoria de esta especie [9], los extractos orgánicos acetato de etilo y diclorometano, mostraron una ligera actividad antiinflamatoria, mientras que el extracto hexánico y metanólico resultaron excelentes inhibidores del proceso inflamatorio inducido por adyuvante de Freund y carragenina.

Estos resultados han sido corroborados en los ensayos realizados sobre los extractos hexánico y metanólico, observándose una inhibición del proceso artrítico a lo largo de toda la experiencia.

El extracto hexánico muestra una interesante actividad antiinflamatoria, de comportamiento constante, en ambas fases de la inflamación, mientras que el extracto metanólico inhibe la fase tardía con mayor eficacia, si bien no es tan activo en la fase aguda.

Así mismo, los ensayos realizados con la infusión de esta especie, forma de uso popular, demuestran una notable actividad de la misma, en las dos fases del proceso inflamatorio, presentando los porcentajes de actividad más elevados, incluso superando al patrón de referencia empleado, fundamentalmente en la fase crónica.

Por tanto, los extractos orgánicos, hexánico y metanólico, de la especie *Teucrium buxifolium* y el liofilizado de su infusión son activos frente a la artritis experimental inducida en ratas por adyuvante de Freund y carragenina.

En las pruebas experimentales llevadas a cabo, durante la evolución del proceso inflamatorio, se advierte la aparición de lesiones secundarias que acompañan al edema e inflamación local, afectando incluso a los dedos de la pata, como describe Whitehouse [377].

En las experiencias llevadas a cabo, puede observarse cómo se previene la aparición de dichas lesiones, fundamentalmente en los lotes tratados con la infusión de la especie objeto de estudio, analizado bajo examen visual sencillo, como se muestra, a modo ilustrativo, en las siguientes fotografías.



Fotografía 1. Extremidad posterior izquierda de un animal de experimentación
antes de inducir el proceso inflamatorio



Fotografía 2. Extremidad posterior izquierda correspondiente a un animal del lote control,
a las 96h de la administración de carragenina



Fotografía 3. Extremidad posterior izquierda correspondiente a un animal del lote patrón (fenilbutazona), a las 96h de la administración de carragenina



Fotografía 4. Extremidad posterior izquierda correspondiente a un animal del lote problema infusión de *Teucrium buxifolium*, a las 96h de la administración de carragenina

EDEMA PLANTAR AGUDO

El modelo experimental de reproducción del edema plantar agudo por inyección de carragenina, descrito por Winter [383] para ratas, fue modificado para ratones por Sugishita [315], sugiriendo resultados totalmente comparables a los obtenidos en ratas.

Se ha recurrido a este método experimental de valoración de la actividad antiinflamatoria, por varias razones.

En primer lugar, dada la peculiar naturaleza del material objeto de estudio y su escasez, era aconsejable la elección de modelos experimentales que requiriesen un menor consumo de muestras problema. Era necesario disponer de un modelo que cumpliera dicho requisito, para así poder realizar el seguimiento de la actividad antiinflamatoria, de las fracciones que se obtendrían durante los procesos cromatográficos de purificación y aislamiento de principios activos, que en un futuro se desarrollasen.

La alternativa de inducir la artritis reumatoidea en un animal de experimentación de menor calibre, como el ratón, podría haber sido la solución, pero diversos autores han comprobado que la artritis experimental no evoluciona satisfactoriamente en los ratones, ya que parecen resistentes al desarrollo de patogénesis inflamatoria crónica por adyuvante [155,157].

Por otro lado, el edema provocado en la artritis experimental no representa un modelo de curso exclusivamente agudo. La intensidad de dicho edema sólo es equiparable a la que provocaría la carragenina por sí sola, durante las tres primeras horas [209], proporcionando una información insuficiente acerca del proceso agudo, ya que este agente flogístico provoca una inflamación que se desarrolla, como ya se ha indicado, en tres fases que van desde tiempo cero hasta, al menos, las 6 horas posteriores a su administración [263,264,265].

Por ello, el edema plantar por carragenina en ratones suponía la mejor elección, ya que por un lado presenta la gran ventaja de precisar la administración de dosis inferiores de los productos a ensayar; y por otro lado, permite ampliar el conocimiento que, sobre la actividad

antiinflamatoria del material objeto de estudio, proporciona el modelo de inducción experimental de artritis.

Bases Patogénicas

La patogenia del edema plantar por carragenina ha sido descrita en la fase aguda del proceso artrítico inducido, y los mediadores y fenómenos celulares detallados son, precisamente, los implicados en este modelo experimental.

Protocolo Experimental

Asumiendo las modificaciones de Sugishita [315] del método descrito por Winter [383], se evalúa la actividad antiinflamatoria aguda de los extractos hexánico y metanólico y de la infusión de la especie objeto de estudio, empleando, como animal de experimentación, ratones hembra de raza OF1, de peso homogéneo de $25 \pm 2g$.

Se procede a la distribución aleatoria de los animales, en grupos de 6 individuos, manteniéndolos en las condiciones de estabulación standard definidas y estableciendo los mismos lotes que en el modelo de inducción de artritis experimental. Los tratamientos se vehiculizan en la proporción de 1mL/animal, empleando la vía oral para la administración, a través de sonda gástrica.

Como fármaco patrón se recurre de nuevo a la fenilbutazona, administrada a la dosis de 80mg/Kg. Los extractos de *Teucrium buxifolium*, así como la infusión de la especie, se administran a las dosis ya indicadas, dosis que son equivalentes a 12.5g de planta seca/Kg de peso de animal [364].

Transcurrida una hora de la administración de los correspondientes tratamientos, se procede a la inyección subcutánea de una dosis de 0.05mL de λ -carragenina al 3% en suero fisiológico, en la aponeurosis plantar de la pata izquierda de todos y cada uno de los ratones.

Se realiza, inmediatamente antes de la administración de la carragenina, la medida pletismométrica del volumen basal de cada ratón y posteriormente se mide el volumen plantar, a las 3, 5 y 7 horas.

El desplazamiento de líquido que provoca la pata del ratón es inferior que al tratarse de ratas, por lo que la susceptibilidad del aparato ha de optimizarse; para ello, la cubeta del pletismómetro contendrá, en este caso, una solución de ClNa al 2% y ha de llenarse hasta un nivel superior, ya establecido. El pletismómetro se calibra mediante la tara de polietileno, de forma que desaloje un volumen de valores comprendidos en el intervalo de 4.78 - 4.82, estabilizando el aparato en cada una de las medidas realizadas.

Se calculan los incrementos de volumen para cada ratón, por diferencia entre el volumen basal, previo a la administración de carragenina, y las medidas del volumen plantar a las distintas horas. Con la media aritmética de los incrementos de volumen de cada uno de los lotes, y por comparación con los lotes control, se obtienen los porcentajes de inhibición del proceso inflamatorio, de igual forma que en el anterior modelo experimental. Así mismo, se calcula también la actividad de los productos a estudio con respecto al patrón utilizado.

El análisis estadístico se realiza mediante la 't de Student', hallando la media aritmética y el error standard de los incrementos de volumen, para los distintos lotes, así como el nivel de significación estadística de los grupos tratados, frente al control. La comparación entre los distintos lotes tratados se realiza mediante la prueba multidimensional de 'Newman-Keuls'.

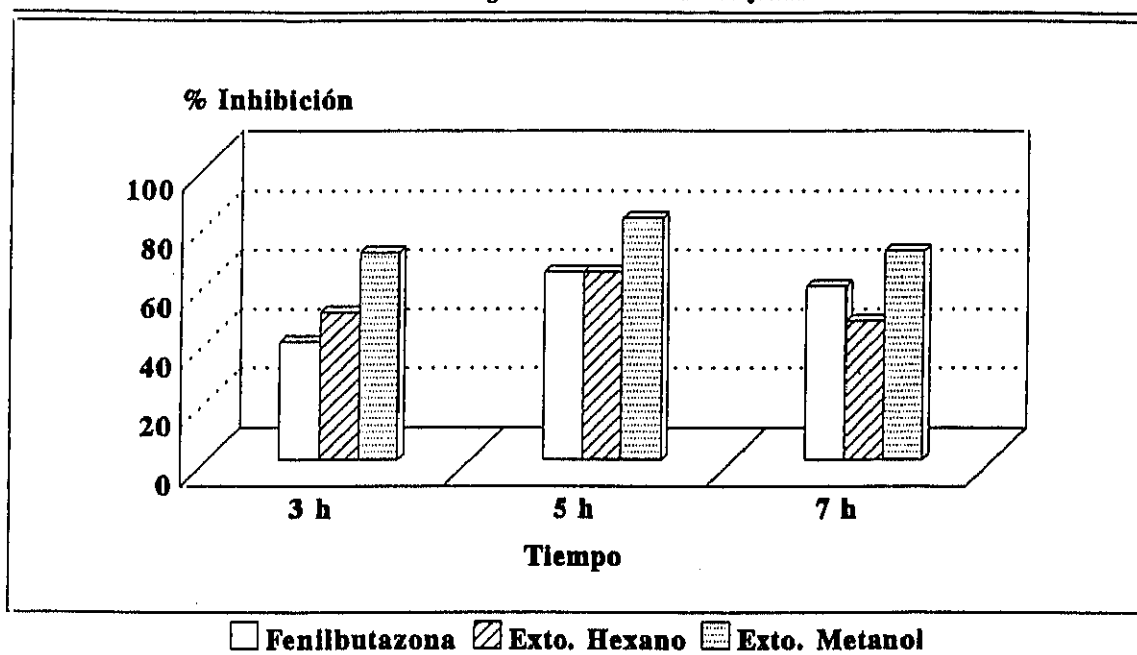
Resultados

Las tablas V y VI reflejan el valor de la media aritmética \pm error standard de los incrementos de volumen, correspondientes a los distintos grupos ($\Delta V \pm ES$), la actividad inhibidora del proceso inflamatorio de cada uno de los tratamientos, con respecto al lote control (% Inhibición) y el porcentaje de actividad antiinflamatoria frente al patrón.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE AL EDEMA PLANTAR AGUDO			
$\Delta V \pm ES$			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	0.20 \pm 0.008	0.22 \pm 0.010	0.17 \pm 0.005
Fenilbutazona	0.12 \pm 0.006	0.08 \pm 0.006	0.07 \pm 0.007
Extracto hexánico	0.10 \pm 0.008	0.08 \pm 0.014	0.09 \pm 0.011
Extracto metanólico	0.06 \pm 0.005	0.04 \pm 0.010	0.05 \pm 0.009
% INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	---	---	---
Fenilbutazona	40.00 %	63.64 %	58.82 %
Extracto hexánico	50.00 %	63.64 %	47.06 %
Extracto metanólico	70.00 %	81.82 %	70.59 %
% ACTIVIDAD RESPECTO AL PATRÓN			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	---	---	---
Fenilbutazona	100.00 %	100.00 %	100.00 %
Extracto hexánico	125.00 %	100.00 %	80.01 %
Extracto metanólico	175.00 %	128.57 %	120.01 %

Tabla V. Actividad antiinflamatoria de los extractos hexánico y metanólico de la especie *Teucrium buxifolium*, frente al edema plantar agudo provocado por la carragenina, $p < 0.01$ vs. control.

EDEMA PLANTAR AGUDO
INHIBICIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO
Extractos orgánicos de *Teucrium buxifolium*

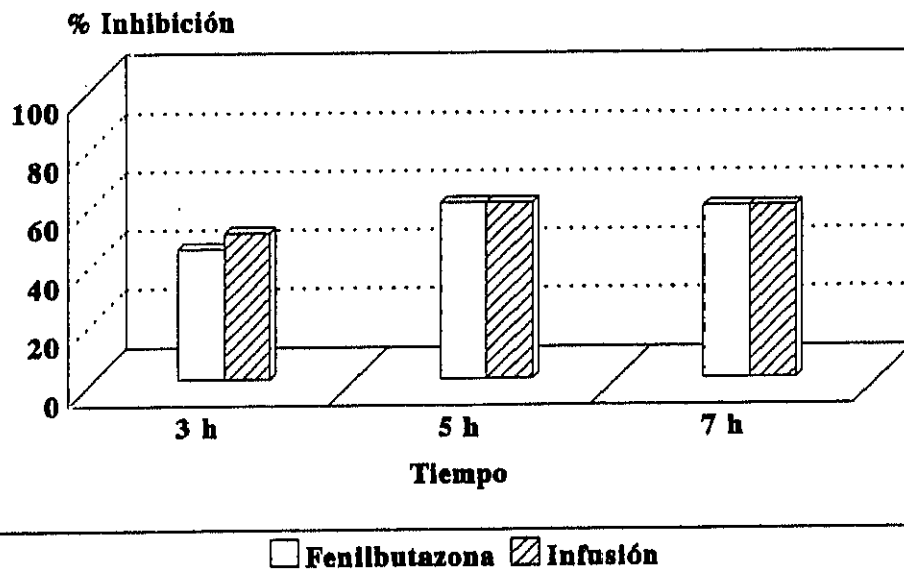


Gráfica 3.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE AL EDEMA PLANTAR AGUDO			
$\Delta V \pm ES$			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	0.18 \pm 0.005	0.20 \pm 0.005	0.17 \pm 0.004
Fenilbutazona	0.10 \pm 0.007	0.08 \pm 0.012	0.07 \pm 0.008
Infusión	0.09 \pm 0.004	0.08 \pm 0.009	0.07 \pm 0.008
% INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	---	---	---
Fenilbutazona	44.44 %	60.00 %	58.82 %
Infusión	50.00 %	60.00 %	58.82 %
% ACTIVIDAD RESPECTO AL PATRÓN			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	---	---	---
Fenilbutazona	100.00 %	100.00 %	100.00 %
Infusión	112.51 %	100.00 %	100.00 %

Tabla VI. Actividad antiinflamatoria del liofilizado de la infusión de la especie *Teucrium buxifolium*, frente al edema plantar agudo provocado por la carragenina. $p < 0.01$ vs. control.

EDEMA PLANTAR AGUDO
INHIBICIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO
Liofilizado de la infusión de *Teucrium buxifolium*



Gráfica 4.

Los lotes control siguen una misma evolución, independientemente de los distintos vehículos empleados, por lo que éstos no ejercen influencia alguna sobre el curso del proceso inflamatorio. Así mismo, los lotes cuyo tratamiento consistió en el fármaco de referencia presentan una misma actividad antiinflamatoria, confirmando la no influencia del vehículo en el modelo experimental.

El extracto hexánico de *Teucrium buxifolium* presenta una notable actividad inhibidora del proceso inflamatorio agudo, de comportamiento similar al presentado por la fenilbutazona, aunque con un porcentaje de inhibición, a las 3 h de la administración de carragenina, algo más elevado que el patrón, mientras que éste supera al extracto hexánico en su actividad a las 7 h.

El liofilizado de la infusión muestra una actividad antiinflamatoria totalmente equiparable, prácticamente idéntica a la de fenilbutazona, a lo largo del proceso edematógeno agudo.

Por su parte, el extracto metanólico de la especie objeto de estudio, inhibe el edema plantar por carragenina, con mayor eficacia que el resto de tratamientos, presentando una destacada actividad, incluso alcanzando una inhibición del proceso de valores próximos o superiores al 80%.

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

En los ensayos de actividad antiinflamatoria realizados -artritis generalizada y edema plantar agudo- se han empleado distintos lotes control a los que no se administró tratamiento alguno, tan sólo los vehículos utilizados para la disolución/suspensión de los tratamientos problema (CMC y tween 80 para el extracto hexánico y metanólico, y agua, en el caso del liofilizado de la infusión).

De los resultados obtenidos se puede concluir que los distintos vehículos empleados no ejercen ninguna influencia en el desarrollo de los procesos inflamatorios experimentales inducidos: artritis generalizada y edema plantar agudo, ya que los distintos lotes control, de cada uno de los modelos experimentales, siguen una misma evolución, independientemente del vehículo empleado.

El fármaco de referencia escogido fue en ambos protocolos experimentales la fenilbutazona, AINE de reconocido prestigio, empleándose a la dosis de 80mg/Kg. En cada uno de los modelos experimentales se emplearon distintos lotes patrón, según el vehículo de los tratamientos problema.

Los resultados obtenidos confirman, por un lado, la no influencia del vehículo en el modelo experimental, al observar que su actividad antiinflamatoria no varía dependiendo del vehículo que es empleado. Por otro lado, la fenilbutazona ratifica plenamente su potencia antiinflamatoria, tanto en el proceso artrítico, como en el edema plantar por carragenina.

La especie *Teucrium buxifolium* fue objeto de estudio en un screening antiinflamatorio preliminar, en el que demostró su potente actividad antiinflamatoria en la artritis generalizada, fundamentalmente los extractos orgánicos hexánico y metanólico [9].

Ambos extractos corroboran su actividad inhibidora del proceso artrítico en los ensayos realizados, en el desarrollo experimental de esta Memoria de Investigación.

Así mismo, se ensayó también la actividad antiartrítica de la infusión de esta especie, mostrando una destacada actividad, de índole incluso superior a la presentada por el patrón de referencia. Además, tanto los extractos hexánico y metanólico, como el liofilizado de la infusión demuestran una actividad antiinflamatoria en fase aguda, en el modelo del edema plantar por carragenina, de notable interés, en ocasiones por encima de la actividad de la fenilbutazona.

En el proceso de artritis generalizada el extracto hexánico posee una interesante actividad antiinflamatoria, de comportamiento constante, en ambas fases de la inflamación, con porcentajes de inhibición próximos o superiores al 50%, en la etapa tardía. En el edema plantar por carragenina el extracto hexánico presenta una destacada actividad antiinflamatoria aguda, equiparable a la del fármaco de referencia.

El extracto metanólico de la especie inhibe la artritis inducida por adyuvante de Freund y carragenina a lo largo de toda la experiencia, fundamentalmente en la fase crónica del proceso. La actividad antiinflamatoria del extracto metanólico frente al edema plantar agudo fue muy destacada, con porcentajes de inhibición del orden del 70-80%, superando al resto de los tratamientos, incluido el patrón, fenilbutazona.

La infusión de *Teucrium buxifolium*, forma de uso popular, demuestra mayor eficacia que los extractos hexánico y metanólico, frente a la artritis generalizada en rata. Inhibe, tanto la fase aguda, como crónica del proceso artrítico con un comportamiento similar a la fenilbutazona, con niveles de inhibición más elevados que ésta, en los últimos días de los ensayos. Así mismo, el liofilizado de la infusión presenta también una actividad totalmente equiparable a la del patrón, incluso algo superior, frente al edema plantar agudo por carragenina.

Estos resultados justifican el empleo en medicina popular que se hace de esta especie en todo tipo de procesos inflamatorios, siendo posible conjeturar que la actividad del extracto hexánico podría ser debida a compuestos de naturaleza terpénica, habiendo sido ampliamente demostrada la actividad antiinflamatoria de diversos compuestos sesquiterpénicos,

sesterterpenos, diterpenos, triterpenos... [2,4,91,147,180,247,366,367,368,390,389; Apéndice II: Tesis 1,5,7,10]; mientras que la actividad del extracto metanólico podría atribuirse a compuestos flavónicos, ya que se conocen diversos flavonoides con actividad antiinflamatoria [2,6,29,150,227,360,343]. La interesante actividad antiinflamatoria de la infusión de la especie, podría deberse a que los heterósidos son solubles en agua, por lo que, en la infusión, los azúcares unidos a las distintas geninas, podrían hacer que la posible actividad de éstas se vea potenciada.

ÚLCERA

CONSIDERACIONES GENERALES

La úlcera péptica es el resultado de una lesión, con necrosis y digestión de la mucosa gastroduodenal y, como su mismo nombre indica, en su patogenia se encuentra implicada la acción del jugo péptico ácido y probablemente, una cierta vulnerabilidad de la mucosa digestiva [306]. La epidemiología de la úlcera péptica gastroduodenal estima que, entre el 6-15% de la población, se ve afectada por esta patología en algún momento de su vida [242] y uno de los más importantes factores de riesgo está protagonizado por el consumo de AINE [10]. El efecto secundario principal y más frecuente, de este grupo farmacológico, es la irritación de la mucosa gástrica, con formación de hemorragias. Las terapias esporádicas, cortas y de baja dosificación, no suelen ocasionar serios problemas, sin embargo en tratamientos prolongados y a dosis elevadas, como corresponde a cuadros inflamatorios crónicos, los efectos colaterales gastrointestinales constituyen un importante factor limitante de su uso, siendo este grupo uno de los que mayor porcentaje de reacciones adversas presenta.

TOXICIDAD GASTROINTESTINAL DE LOS AINE

El daño que estos fármacos ocasionan a nivel de la mucosa gastroduodenal, comprende un amplio espectro de lesiones, que reciben el nombre de gastropatía por AINE [266]. Se caracterizan por inducir lesiones y alteraciones gastrointestinales, como ulceración de mucosas y producción de hemorragias, ocultas o en forma de accidentes agudos, especialmente en los tramos altos del tubo digestivo. Pueden provocar otros efectos de menor gravedad -pero no por ello poco molestos, sobre todo si el consumo de estos fármacos ha de ser de forma reiterada- como pueden ser pirosis, dispepsias, gastritis, dolor epigástrico, diarrea o estreñimiento. Las náuseas y vómitos son frecuentes, e incluso pueden acompañarse de hematemesis, en casos de hemorragia intensa, o melena.

disolución lenta, con depósito en forma de partículas en los pliegues de la mucosa gástrica, lo que conlleva la aparición de erosiones y petequias.

Generalmente, la ulceración se sitúa a nivel del fundus y antro pilórico y duodeno; las lesiones en intestino delgado pueden ser debidas al incremento en el flujo biliar [40]. Los preparados de liberación retardada provocan la dispersación de los puntos ulcerogénicos en distintas zonas del intestino delgado. Por vía rectal pueden producirse lesiones en la mucosa anal.

Los mecanismos por los que lesionan la mucosa gástrica son complejos y los efectos deletéreos resultan de acciones locales, como la retrodifusión de ácido -debido al carácter ácido débil que presentan la mayoría de los AINE- que induce una irritación directa de las células mucosas y los capilares de la submucosa, provocando la destrucción física y pérdida de las propiedades de permeabilidad, con la consiguiente necrosis y hemorragia. Tras la absorción se acumulan concentraciones altas de aniones en la mucosa, originando la liberación de radicales de oxígeno (RL) y enzimas lisosomales por el tejido. Elevadas concentraciones pueden llegar a alterar el metabolismo del ATP en la mucosa, necesario para mantener las funciones de las células, su regeneración y la síntesis de *nuovo*. Otros factores que participan en la patogenia de la lesión gastrointestinal, son las modificaciones inmunológicas que se provocan por infiltración de diversos leucocitos, confluencia de factores ulcerogénicos, como alcohol, estados de stress -quizá por el dolor crónico articular-, hiperacidez...La adherencia de leucocitos al endotelio vascular parece ser un factor importante en la patogénesis de la ulceración inducida por AINE, éstos leucocitos pueden contribuir a la instauración de la lesión por ocluir los microvasos, al reducir el flujo sanguíneo mucosal y, probablemente también por la liberación de diversos mediadores celulares, proteasas y RL, que conducen a la necrosis tisular [201,372].

Por otro lado, la inhibición de la síntesis de PG, mecanismo por el cual se postula que los AINE ejercen su actividad farmacológica, significa una pérdida del equilibrio existente entre los llamados factores agresivos

y protectores de la mucosa gástrica, con aumento de la secrección ácida y descenso de la producción de *mucus*.

El mecanismo por el que las PG ejercen efecto protector sobre la mucosa gastroduodenal, aún no ha sido totalmente esclarecido. En condiciones fisiológicas, en la mucosa gastroduodenal se sintetizan PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGI_2 . Estos prostanoides inhiben la secrección de ácido, a través de la activación de la proteína fijadora de guanosintrifosfato, que inhibe a la adenilciclasa [373]. Incrementan la secrección de *mucus* y bicarbonato a nivel gástrico y duodenal, y estimulan el flujo sanguíneo en la mucosa gástrica en base a sus propiedades vasodilatadoras. Este flujo sanguíneo parece correlacionarse con la secrección de bicarbonato, y la capacidad de la circulación de la mucosa gástrica, para transportar este ión hasta su superficie, contribuye relevantemente al mantenimiento de su integridad. Se ha observado que el tratamiento preventivo con análogos de PG en pacientes tratados con AINE, es muy eficaz en el caso de la úlcera gástrica [143]. La baja eficacia observada con los fármacos inhibidores de la secrección gástrica sugiere que es más importante el papel protector de mucosa de las PG, que su capacidad inhibidora de la secrección ácida.

Por tanto, parece inevitable que exista algún tipo de gastropatía, acompañando al tratamiento antiinflamatorio con AINE, al menos con aquellos de los que se reconoce un mecanismo de acción relacionado con la síntesis de PG, ya que los efectos gastroerosivos que inducen dependen de este mismo mecanismo de acción.

ETIOPATOGENIA DE LA ÚLCERA PÉPTICA GASTRODUODENAL

La úlcera péptica gastroduodenal se entiende como un conjunto heterogéneo de alteraciones, que de forma aislada o en combinación, son capaces de provocar la erosión y degradación de la mucosa gastroduodenal [143].

La ruptura del balance existente entre la secrección del jugo gástrico y pepsina y el grado de protección, ejercido por la barrera mucosa gastroduodenal y la neutralización del ácido gástrico por las secreciones duodenales, provoca la exposición de la mucosa a la acción lesiva del jugo gástrico y pepsina. Aparecen en aquellas zonas que pueden entrar en contacto con la secrección ácido-péptica del estómago, tercio inferior del esófago - donde con frecuencia hay reflujo de los jugos gástricos-, estómago y porción alta del intestino delgado, o la pequeña porción del intestino delgado vecino de una gastroenterostomía permeable o un divertículo de Meckel, que contenga glándulas gástricas ectópicas.

La mayoría de las úlceras pépticas se presentan a lo largo de la curvatura menor del estómago y en los primeros 3-4cm del duodeno, zona conocida como 'bulbo duodenal' [306].

Es posible diferenciar, al menos en cuanto a su localización y frecuencia, entre úlceras duodenales, que aparecen a lo largo de la curvatura menor del extremo antral del estómago o antro pilórico, y úlceras gástricas, situadas en la curvatura del estómago.

Las úlceras gástricas son menos frecuentes que las duodenales, y con menor incidencia puede existir ulceración en otras zonas, como el extremo inferior del esófago o yeyuno. También se presenta a menudo la denominada úlcera marginal, en las comunicaciones anormales entre estómago e intestino delgado, como una gastroyeyunostomía.

La etiología de la úlcera péptica no ha sido establecida de una forma absoluta, aceptándose la hipótesis de que se trata de un cuadro patológico heterogéneo, expresión común de un conjunto de alteraciones, con diferente base genética y ambiental, por lo que se puede hablar de una serie de

factores que influyen en su aparición, factores genéticos y factores exógenos ambientales. No obstante, hoy en día el concepto de úlcera péptica está totalmente superado, ya que aunque la úlcera duodenal y gástrica comparten algunos de estos factores etiopatogénicos, debido a su variabilidad, fisiopatología y localización, han de considerarse como dos entidades nosológicas absolutamente diferentes.

ÚLCERA GÁSTRICA

La úlcera gástrica no sólo es una entidad propia, sino que además es un cuadro patológico heterogéneo polietiológico. Consiste en una pérdida crónica de materia mucosal, producida por la acción proteolítica del ácido y pepsina, quizá sobre una mucosa gástrica ya dañada bajo una gastritis [269,356], ya que las úlceras se forman cuando la mucosa no resiste el efecto corrosivo del ácido gástrico [373].

Mientras que la úlcera duodenal parece resultar de un aumento en la potencia de los factores pépticos ácidos que atacan a la mucosa, en la úlcera gástrica el defecto primario quizá no sea una mayor secrección de ácido, sino una disminución en los mecanismos protectores de la mucosa y los factores exógenos que contribuirían a la ulcerogénesis, haciendo a la mucosa más susceptible [269,306,373].

Generalmente, aparece en la mucosa antral adyacente a la mucosa fúndica secretora, y sólo el 8% en plena mucosa fúndica. La mayoría se asientan en la pequeña curvatura del estómago, en la región de la *incisura angularis* o en la parte inferior del cuerpo gástrico [223]. Esta predilección por la curvatura menor sigue sin tener una explicación aparente, ya que esta región está menos vascularizada, aunque a este nivel se disponen unos haces musculares prominentes y subyacentes [269], es decir que se sitúan por debajo de la mucosa, por lo que las contracciones musculares de dicha zona podrían interferir y comprometer la circulación y producir isquemia, causando la ulceración [143,356]. Como en todos los síndromes de isquemia-reperfusión, se ha postulado que los RL podrían intervenir de alguna manera en dicha ulceración [250,321], de hecho se proponen estrategias terapéuticas con

'scavengers' para reducir el daño a la mucosa, tanto en úlceras gástricas como duodenales [113,271].

Además de la predisposición anatómica de la zona en que aparecen estas úlceras, se han descrito otras anomalías fisiopatológicas. La úlcera gástrica, por lo general, no se asocia con una anormalidad constante de secrección ácida, pero requiere ácido para formarse, aunque el axioma de Schwartz -'sin ácido no hay úlcera'- tiene algunas excepciones; la úlcera gástrica con aclorhidria indica cáncer gástrico y la úlcera en el cuerpo del estómago es raro que curse con secrección de ácido aumentada [373]. La secrección de pepsinógeno no se encuentra modificada, mientras que la motilidad gástrica presenta alteraciones que facilitan el reflujo biliar duodenogástrico y de jugo pancreático, como puede ser una disminución en la presión del esfínter pilórico [269], que debido a una malformación no se cierra en forma normal después de penetrar el ácido, proteína o grasa, en el duodeno [306], provocándose una ruptura de la mucosa con retrodifusión de hidrogeniones. Generalmente, se retrasa el vaciado gástrico de los sólidos, con lo que el estímulo antral de la comida se mantiene más tiempo [143].

Por tanto, en la patogenia de la úlcera gástrica parecen necesarios ciertos eventos, que son: isquemia, existencia de ácido, aún en pequeñas cantidades, y rotura de la barrera mucosal gástrica, que provoca aumento de la difusión retrógrada de H^+ [269].

Puede ser desde una simple penetración a través de la *muscularis mucosae*, hasta perforación a través de la serosa. El cráter ulceroso suele tener bordes bien delimitados y poco elevados y el fondo de la úlcera acostumbra a ser grisáceo o amarillento, con restos necróticos. Además se altera la secrección de *mucus*, con formación de un gel defectuoso.

El examen microscópico revela cuatro capas, exudado superficial fibrinoleucocitario, restos necróticos amorfos, tejido de granulación y fibrosis. En ocasiones, las arteriolas se obliteran por una necrosis fibrinoide [356].

Johnson [151] sugirió que no todas las úlceras gástricas tenían la misma patogenia, por lo que estableció la siguiente clasificación:

- Tipo I Úlcera gástrica crónica, por encima de la *incisura angularis*, sin evidencia de anormalidades en el resto del estómago o del duodeno.
- Tipo II Úlcera gástrica crónica, en la región de la *incisura angularis*, en ocasiones por encima de la misma, asociada con úlcera duodenal activa o cicatriz ulcerosa en el duodeno.
- Tipo III Úlcera gástrica crónica de la región prepilórica (a 3cm, o menos, del píloro), con úlcera duodenal concomitante o sin ella, o úlcera gástrica del tipo I.

Este autor indicó que las úlceras se diferenciaban por las características de secreción gástrica, ya que la tipo I cursa con clorhidrias bajas y la II y III con acidez elevada y patrón de secreción similar al de úlceras duodenales [151].

Este cuadro cursa con dolor epigástrico, que se experimenta en la línea media, parte alta del epigastrio, debajo del apéndice xifoides, con tendencia a desplazarse hacia la izquierda de la línea media [306], con sensación de saciedad postprandial y que no se alivia con la ingesta de alimentos, sino que puede acentuarse.

La epidemiología indica que, en el mundo occidental, la frecuencia de la úlcera duodenal se halla cercana al doble que la de la úlcera gástrica, sin embargo, en Japón se observan de 5 a 10 veces más úlceras gástricas. Este predominio de la úlcera gástrica sobre la duodenal se ha señalado también en Sri Lanka, Chile, región Andina y Turquía. No se puede hablar de diferencias raciales, ya que no hay datos suficientes que lo corroboren, aunque por ejemplo la población china americana la padece con más frecuencia de lo esperado [356]. Por lo general, ocurren más tarde que las duodenales y tienen su frecuencia máxima en la quinta década de la vida. La relación con respecto al sexo estaba establecida en 2/1 -varones/hembras [269]-, aunque en la actualidad parecen haberse equilibrado estas diferencias [242].

No se ha podido detectar ninguna variabilidad estacional en el desarrollo de la úlcera gástrica [356].

Con respecto a los factores genéticos la úlcera gástrica es más frecuente entre los familiares de enfermos que en la población normal. Los individuos de grupo sanguíneo O poseen un especial riesgo de úlcera antral, pero no en la parte alta de la pequeña curvatura, así como mayor riesgo de desarrollar, simultáneamente, úlcera gástrica y duodenal [356], pero frecuencia normal de úlcera de duodeno [306].

A pesar de los numerosos estudios que intentan relacionar la frecuencia de la úlcera gástrica con la calidad de dieta, no existen evidencias fidedignas de dicha relación. El consumo de alimentos ricos en fibra dietética es de importancia dudosa, sin embargo sí que existe una relación estadística, clara y lineal, entre la mortalidad por úlcera gástrica y consumo de sal [308]. También es evidente una relación entre el consumo excesivo de café y la incidencia de úlcera gástrica, en tanto que el abuso del alcohol no parece tener efecto alguno sobre tal incidencia [356].

El consumo habitual de tabaco se ha asociado como factor de riesgo, pero el motivo por el cual tiene acción nociva no está definido, entre las hipótesis que se barajan se halla la de la relajación del esfínter pilórico, que favorece el reflujo del contenido duodenal y la inhibición de la secreción pancreática de bicarbonato [356]. Se cree que incrementa la secreción ácida gástrica y se estimula la secreción de pepsinógeno I.

El tabaco parece incrementar la masa de células parietales y su capacidad secretora, se retrasa el vaciado gástrico de los sólidos, aumenta el reflujo biliar duodenogástrico y disminuye el pH intraduodenal, debido a la inhibición de la producción de bicarbonato, tanto en la mucosa duodenal como en el páncreas [143]. Sin embargo, estos mecanismos fisiopatológicos no han sido totalmente demostrados, por lo que existen aún ciertas controversias a la hora de establecer una relación causa-efecto entre el hábito de fumar y la patología ulcerosa.

Por otro lado se especula un posible mecanismo patogénico mediado por los RL generados por el humo de los cigarrillos, postulando un efecto beneficioso para terapias con 'scavengers' [272].

Ya se ha indicado la alta toxicidad gastrointestinal que presenta el grupo farmacológico de los AINE, y de hecho las terapias prolongadas con AINE y la úlcera gástrica parecen estar íntimamente relacionadas, no existiendo esta correlación con el ulcus duodenal. Se cree que las úlceras en la curvatura mayor gástrica son de origen yatrogénico, pero no existe suficiente documentación [356].

Casi todos los pacientes con úlcera duodenal -cerca del 100%- y la mayoría de úlceras gástricas -aproximadamente el 90%- presentan una infección por *Helicobacter pylori*. Esta infección es un buen marcador de susceptibilidad a la enfermedad ulcerosa en Occidente y casi todos los enfermos de úlcera gástrica o duodenal presentan Ac para este microorganismo. No se ha dilucidado la significación fisiopatológica de la infección, ni los mecanismos por los que contribuiría a la formación de la úlcera. Hay que considerar dos posibilidades, que este microorganismo sea un invasor oportunista de una mucosa gástrica dañada y no ejerza ninguna influencia fisiopatológica, o bien que intervenga directamente en la producción de la úlcera, tal vez elaborando una toxina que afecte a la mucosa [373]. Este microorganismo posee una actividad ureasa muy elevada y favorece la retrodifusión ácida que justificaría la hipoclorhidria, rotura de barrera mucosa gástrica y la formación de la úlcera [143].

ÚLCERA DUODENAL

La úlcera duodenal se caracteriza por dos hechos morfológicos, en primer lugar afecta a todo el espesor de la mucosa y profundiza hasta la submucosa; además es de curso crónico, requiriendo al menos dos semanas, con formación de tejido de granulación en su fondo, que al curar origina una cicatriz [270]. Aunque la patogenia de la úlcera duodenal está relacionada con el débito de ácido clorhídrico [212], -generalmente conlleva hipersecreción [269]-, no siempre existe anomalía en la secreción de ácido [373]. Sin embargo, el hecho de que la mayoría remitan con tratamientos antisecretores, demuestra que la presencia de ácido sigue siendo un factor etiopatogénico importante [143].

Existen una serie de anomalías fisiopatológicas que conducen a la hipersecreción de ácido clorhídrico, que pueden actuar de forma aislada o conjunta, como son un incremento en la masa de células parietales, que pueden llegar a ser el doble que en individuos sanos [269], funcionamiento anómalo de dichas células con incremento de la secreción ácida basal y respuesta exagerada a los estímulos secretores, alteración de los mecanismos normales de inhibición de la secreción de gastrina y ácido, incremento de la secreción nocturna de ácido y alteración del metabolismo de la histamina.

Además, se elevan los niveles séricos de pepsinógeno I, en el 50-80% de los casos [143], que parece ser reflejo de mayor actividad péptica intragástrica [269]. Se altera la motilidad gastroduodenal, aumenta el ritmo del vaciamiento gástrico y disminuye la motilidad propulsiva duodenal, por lo que el tiempo de contacto ácido-mucosa es más elevado, agravado por un defecto en el reflejo que controla el vaciado gástrico, en relación con la acidificación duodenal y el déficit en la secreción de bicarbonato [143,269].

Suele originarse una erosión oval o redondeada, con base de color gris o pardo-rojizo, con restos necróticos y bordes gruesos con edema e hiperemia. La mucosa circundante aparece pálida y existe pérdida y alteración del *mucus* [270]. Recientes estudios sugieren que la úlcera activa duodenal cursa con un nivel de especies oxidantes en sangre total, por encima de los niveles de individuos sanos [149].

El examen microscópico indica la existencia también de cuatro capas, exudado fibrinoso con numerosos PMN y eritrocitos, restos necróticos de aspecto hialino, tejido de granulación y en la zona más interna aparece el tejido fibroso [270].

Es muy característico el dolor epigástrico, que puede incluso despertar al paciente y remite con alimentos o antiácidos, con lo que el paciente vuelve a conciliar el sueño y despierta, ya sin dolor. Posee prolongados períodos de remisión y de exacerbación, que pueden ser de días o meses [269].

Los datos epidemiológicos indican mayor frecuencia de la úlcera duodenal, en prácticamente todos los países, excepto en Japón y algunas otras regiones. Las diferencias raciales no están bien estudiadas, pero existen, por ejemplo con respecto a los individuos de raza india de América. En la úlcera duodenal, se han observado además, diferencias geográficas marcadas, incluso en países relativamente pequeños, como Noruega [270]. Aparecen más frecuentemente entre los 20-60 años, con mayor incidencia a los 40, y aunque se establecieron diferencias entre sexos, afectando cuatro veces más al hombre que a la mujer [269], actualmente se observa una tendencia epidemiológica decreciente, más marcada en la población masculina [242], apareciendo una prevalencia similar en ambos sexos, debido también al incremento de la misma en la mujer. Estos cambios pueden ser debidos a factores sociológicos, debido a una mayor participación femenina en la sociedad y aumento de su expectativa de vida, algo superior a la del hombre.

Se consideran con un papel relevante a los factores genéticos, observándose que una historia familiar positiva se asocia a estas patologías, incidencia familiar que podría explicarse tanto por factores ambientales, como por la existencia de factores genéticos comunes. Sin embargo, en estudios realizados sobre gemelos mono y dicigóticos se demuestra un incuestionable componente genético. Se ha descrito una mayor prevalencia en individuos del grupo sanguíneo O, con aproximadamente un 30% más de riesgo de padecer el ulcus duodenal, aunque no se conocen las bases patogénicas de esta relación.

Los individuos que no secretan sustancias de grupo sanguíneo en saliva o jugo gástrico, poseen mayor predisposición a esta patología, siendo un marcador genético, que asociado al grupo sanguíneo O, proporciona un 150% más de posibilidades de desarrollo de la úlcera duodenal, con lo que estos dos marcadores no son aditivos, sino multiplicativos [270]. Parece existir más incidencia de esta patología en individuos portadores de antígenos de histocompatibilidad HLA-B5 o B12 [143], pero no es seguro que sea un marcador genético, ya que los estudios más recientes arrojan datos controvertidos [270].

Actualmente, la hipótesis vigente es la de la heterogeneidad genética que acepta que la úlcera péptica es un grupo heterogéneo de alteraciones, fundamentada en su variabilidad genética, fisiopatológica y clínica. Desde este punto de vista, la úlcera gástrica y duodenal son dos entidades patológicas distinguibles, heredándose por separado el riesgo de *ulcus* [143], los parientes de enfermos de una de las patologías no presentan riesgo aumentado para la otra [306]. En el caso de la úlcera duodenal se sugiere esta hipótesis de heterogeneidad genética, dada la variabilidad de la enfermedad y su asociación a otros procesos patológicos [270].

Existe una **preponderancia estacional**, presentándose mayor incidencia de úlcera duodenal en primavera y otoño [270].

Se intenta asociar la úlcera duodenal a ciertas dietas, concretamente a bebidas y/o especias, pero no existen evidencias que sustenten esta hipótesis. En países en los que los alimentos son fuertemente condimentados, con especias 'picantes', que estimulan la secreción gástrica, no ha sido demostrada una mayor prevalencia y aunque esta condimentación causa dispepsias, no se asocian a mayor incidencia de *ulcus* duodenal. Parece que las dietas ricas en fibra alimentaria reducen la incidencia de la enfermedad [268] y la baja prevalencia de estas patologías en África e India, es atribuida al consumo de dietas ricas en fibra.

No existen datos que demuestren que la ingesta de alcohol se relacione con la úlcera duodenal, a excepción de los pacientes cirróticos, por su enfermedad hepática [270]. Los consumidores habituales de alcohol no

presentan mayor tasa de recidivas o retraso en la cicatrización. Algunos estudios, incluso, concluyen que una ingesta moderada favorece la cicatrización del nicho ulceroso, denominando a este proceso citoprotección adaptativa [143,256].

La cafeína es un estimulante débil de la secrección ácida gástrica, y el café es un estimulante fuerte, por lo que debe existir algún otro principio activo, distinto de la cafeína, responsable de esta estimulación. El café descafeinado por tanto, también se comporta como estimulante de la secrección. Sin embargo, no existen pruebas de una mayor incidencia de esta enfermedad en bebedores de café u otras bebidas, como cerveza y refrescos de cola, también estimulantes gástricos [102,224].

La relación tabaquismo - úlcera duodenal resulta evidente. Los fumadores habituales tienen dos veces más posibilidades de padecer ulcus duodenal que los no fumadores. Retrasa o impide la cicatrización, y aumentan las recidivas [246,373]. Puede que estos pacientes neutralicen con más dificultad el ácido y se especula que podría ser por la capacidad de la nicotina de provocar un déficit en la secrección de bicarbonato pancreático, tanto el asociado a la motilidad gastrointestinal, como el estimulado por la secretina, quizá todo ello debido a una menor liberación de secretina o de otras enterogastronas [246,270].

Con respecto al consumo crónico de AINE, parece existir una relación más evidente con el ulcus gástrico, no establecida con la úlcera duodenal. Sin embargo, si existe un subgrupo de pacientes jóvenes con úlceras duodenales perforadas agudas, en que los AINE cumplen un papel patológico [373]. Es posible que retrasen la cicatrización de las úlceras duodenales y faciliten la complicación hemorrágica [270,373]. Por otro lado, en terapias cortas con esteroides antiinflamatorios no hay influencia en la inducción o evolución de úlcera duodenal [270].

En cuanto a los factores psíquicos, esta entidad patológica se considera una enfermedad psicosomática, pero los datos actuales no pueden demostrar un patrón constante de stress o relacionarla con algún tipo de personalidad concreta, aunque es posible que las situaciones de stress o

angustia favorezcan la aparición de estas úlceras, en individuos concretos [270] o bien, que los pacientes ulcerosos desarrollen mecanismos desencadenantes psicológicos que favorezcan la recurrencia de las úlceras. No se ha definido el mecanismo de la inducción psicológica de úlceras [373].

Como ya se ha indicado, prácticamente todos los pacientes de úlcera duodenal manifiestan una infección por *Helicobacter pylori*, con formación de Ac [373]. Además, se ha observado que los enfermos de patología ulcerosa duodenal presentan títulos de Ac contra el virus del herpes tipo 1, en suero, saliva y jugo duodenal, más altos que en población sana. Este virus podría iniciar un proceso inflamatorio de la mucosa, que disminuiría la resistencia de la misma al daño por agentes agresivos, facilitando así la aparición de úlceras [267].

En síntesis, los datos expuestos con respecto a la úlcera gástrica y duodenal, permiten afirmar que no es del todo correcto hablar de úlcera péptica, ya que estas patologías presentan características distintas y los factores que sobre ambas entidades pueden influir, no siempre coinciden.

En el siguiente esquema se expresa una sinopsis de los factores etiopatogénicos de las úlceras gástrica y duodenal.

FACTOR	Ú. GÁSTRICA	Ú. DUODENAL
Frecuencia	+	++ (doble)
Varón/Hembra	2/1 con tendencia a 1/1	4/1 con tendencia a 1/1
Raza/Geografía	No demostrado	Si
Pico de Edad	50 años	40 años (más temprana)
Variación estacional	No	Primavera/Otoño
Genética	Grupo sanguíneo 0	Grupo sang. 0/HLA-B5,B12
Fibra alimentaria	Dudoso	Beneficioso
Sal	Perjudicial	---
Café	Perjudicial	Sin efecto
Alcohol	No demostrado	No demostrado
Tabaco	Perjudicial	Perjudicial
AINB	Perjudicial	No demostrado
<i>H. pylori</i>	Asociación en 90%	Asociación en 100%
Virus Herpes 1	---	Posible asociación
Factores psicológicos	---	Posible asociación

MATERIAL Y MÉTODOS

ACTIVIDAD ANTIULCEROSA Y CITOPROTECTORA DE *Teucrium buxifolium*

La búsqueda de nuevos principios con actividad antiinflamatoria de origen natural pretende, por supuesto la ampliación del arsenal terapéutico actual, pero además con un objetivo adicional de suma importancia, el hallazgo de compuestos que estén exentos de la toxicidad gastrointestinal inherente al grupo farmacológico de los AINE. Por tanto, el planteamiento realizado nos impulsa al estudio de la actividad de estos principios a nivel gastroduodenal, con el fin de indagar si los mismos están dotados de capacidad ulcerogénica -de igual forma que la mayoría de los AINE- o por el contrario, suponen un gran avance terapéutico al gozar de una actividad antiinflamatoria no ulcígena. Para ello, se proponen dos modelos experimentales que permitan la valoración, por un lado de la actividad antiulcerosa y por otro, la posible capacidad citoprotectora de la mucosa gastroduodenal.

INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA

La patología ulcerosa, aunque no sea específica de la raza humana, es difícilmente reproducible en animales, por implicar una gran diversidad de factores etiopatogénicos. La úlcera gastroduodenal se concibe, más que como una consecuencia de la potenciación de la acción lesiva del jugo gástrico, el producto de un desequilibrio entre los factores protectores de la mucosa y los factores agresivos. El método básico elegido para la valoración de la actividad antiulcerosa ha sido la inducción de úlceras por indometacina en ratas, ya que este modelo experimental reproduce, en gran medida, dicho proceso patológico, debido a que ocasiona un desajuste entre los mecanismos de defensa y la acción lesiva ácido-péptica.

La indometacina es un fármaco que pertenece al grupo de los antiinflamatorios de naturaleza no esteroídica, derivado del ácido indolacético. Se introdujo en la terapéutica antiartrítica a mediados de siglo, presentando poderosa actividad antiinflamatoria, antitérmica y

analgésica, pero al mismo tiempo ocasiona importantes efectos adversos, a nivel neurológico y gastrointestinal, que limitan su uso. Posee un destacado poder ulcerogénico, posiblemente derivado de su mecanismo de acción antiinflamatoria y de hecho, es uno de los más potentes inhibidores de la síntesis de prostaglandinas.

Los efectos colaterales a nivel digestivo se traducen en síntomas de anorexia, náuseas y dolor abdominal. Puede llegar a ulcerar la mucosa, apareciendo lesiones únicas o ulceración múltiple de todo el tracto gastrointestinal superior, incluso con perforaciones y hemorragias.

Bases Patogénicas

La indometacina presenta toxicidad gastrointestinal similar a la del ácido acetilsalicílico [71] y la inducción de úlceras experimentales mediante la administración de indometacina está basada, fundamentalmente en dos hechos: la acción lesiva debida a su carácter ácido y la inhibición de la síntesis de PG.

La indometacina provoca la retrodifusión de ácido a nivel de la mucosa gastroduodenal, ya que debido a su carácter ácido débil no se ioniza en contacto con el medio ácido del estómago (pH=3.5), siendo fácilmente absorbible por las células epiteliales de la mucosa [39], ya que atraviesa la doble membrana lipídica celular [322]. La alteración del metabolismo fosforilativo mitocondrial ocasiona la reducción de los niveles de ATP, y la deplección energética lleva consigo la pérdida de las propiedades de permeabilidad de la membrana [322]. Como consecuencia del desequilibrio iónico, se acumulan altas concentraciones de Na^+ , Ca^{2+} y agua en la mucosa, liberación de enzimas lisosomales y generación de RL [322]. Todo ello desencadena la muerte celular, con la consiguiente exfoliación de la mucosa.

La indometacina incrementa la permeabilidad vascular, provocando la exudación plasmática y comprometiendo gravemente la circulación a nivel de los capilares de la submucosa, con obliteración de los vasos debido al enlentecimiento del flujo sanguíneo mucosal [322]. La acumulación de

leucocitos provoca la liberación de productos derivados de la vía de la LO, como el LTB₄ [207,322], PAF, enzimas proteolíticos y especies oxidantes [201,347,372], todos ellos probablemente implicados en la patogénesis de la lesión ulcerativa. Parece ser que los RL juegan un importante papel en el desarrollo del daño mucosal, asociado con la hipermotilidad gástrica [326], así como con la regulación de la actividad fibrinolítica, mediada por el PAF en la microvasculatura mucosal [161].

El efecto antisecretor del jugo gástrico, la secreción de bicarbonato, la vasodilatación y mantenimiento de un flujo sanguíneo, la capacidad trófica y secreción de *mucus*, confeccionan la función protectora de las PG [143]. Por ello, la inhibición de la síntesis de estos prostanoïdes, provocada por la indometacina [97], lleva consigo un desajuste de los mecanismos defensivos de la barrera mucosal, por lo que ésta se hallará expuesta a la acción corrosiva del ácido y la pepsina. Disminuye el grosor y viscosidad de la capa de *mucus* que tapiza la mucosa gastroduodenal, así como el flujo sanguíneo, con lo que se incrementa ligeramente la secreción de ácido [322], a lo que se suma una reducción de la secreción del ión bicarbonato, dificultándose la neutralización del ácido.

Cuando el pH del estómago es superior, la indometacina se ioniza, debido a poseer un pK_a de 4.5, con lo que no es absorbida por las células mucosas y al no acumularse intracelularmente, no ocasiona los graves efectos descritos. Por ello, la manifestación de actividad antisecretora por parte de los compuestos en estudio, protegerá frente al daño causado por la indometacina.

La producción experimental de úlceras es dosis dependiente [26], y requiere la presencia de ácido luminal para la inducción de las lesiones [39], por lo que la administración de una dosis única, pero elevada, de indometacina, ocasiona la aparición de úlceras gástricas en un corto período de tiempo, de aspecto macroscópico fácilmente reconocible y cuantificable, siendo suficiente la observación de los estómagos a las cinco horas del tratamiento, para efectuar la valoración del grado de lesión.

La ranitidina es el fármaco de referencia utilizado como patrón en este protocolo experimental. Antagoniza las acciones que posee la histamina como mediador común final de la secreción gástrica, por bloqueo competitivo de los receptores H_2 , inhibiendo dicha secreción en condiciones basales y en respuesta a estímulos. Disminuye tanto el volumen de secreción gástrica como la cantidad de ácido secretado, al 100% en secreción normal y al 90% en la estimulada, en el hombre y en animales. Sin embargo, en aquellos modelos experimentales que no dependen de la secreción ácida gástrica para la inducción de las lesiones ulcerosas, la ranitidina no demuestra efectividad contra dichas úlceras, por lo que se deduce que no posee capacidad citoprotectora [307].

Protocolo Experimental

La inducción experimental de úlceras se realiza por la administración oral de indometacina, siguiendo el modelo descrito por Lee [175].

Como animal de experimentación se eligieron ratas hembra de raza Wistar, con un peso homogéneo de $175 \pm 25g$.

Generalmente, la raza que se emplea en las técnicas de valoración de fármacos con actividad antiulcerosa suele ser Sprague-Dawley; sin embargo, se optó por la raza Wistar, debido a que el resto de ensayos de valoración biológica han sido realizados sobre ésta última y el objetivo principal es comprobar que el material objeto de estudio no posee actividad ulcogénica, por lo que no era recomendable establecer modificaciones con respecto a la raza de los animales. De todas formas, en ensayos preliminares pudo observarse que no había diferencias significativas entre los resultados obtenidos en lotes control y patrón, con respecto a una y otra raza. Además, se eligieron hembras, en primer lugar por el motivo ya citado, en segundo lugar dada la tendencia actual a igualarse la prevalencia ulcerosa entre sexos en humanos, lo que indica que no deben existir factores ligados al sexo en esta patología, y en tercer y último lugar porque el índice de ulceración que se obtiene en animales hembras prácticamente no difiere con respecto a machos.

Los animales se pesan y son distribuidos aleatoriamente en grupos de 6 individuos, manteniéndolos en jaulas de enrejado metálico -para evitar que se alimenten con sus propias heces y/o el serrín-, en condiciones de estabulación convencional, a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, dieta de mantenimiento PANLAB y agua de la red, al menos durante 2-3 días antes de los ensayos, sometiéndolos a ayuno alimentario y manteniendo el agua *ad libitum*, durante las 24h previas a la experiencia.

Los ensayos se realizan sobre los dos extractos orgánicos de *Teucrium buxifolium*, cuya actividad antiinflamatoria ha sido más satisfactoria: extracto hexánico y extracto metanólico; así como sobre el liofilizado de la infusión de esta especie, administrando todos ellos a una dosis equivalente a 12.5g de planta seca/Kg de peso de animal [364], de igual forma que en los ensayos de actividad antiinflamatoria.

En todos los casos, los tratamientos, incluido el patrón (ranitidina, 100mg/Kg), se vehiculizan en la proporción de 1mL/100g de peso de animal, realizando la administración por vía oral, mediante el uso de sonda esofágica.

Los lotes de administración establecidos son los siguientes:

1.- Lote control al que se administra el vehículo en que han sido disueltos los extractos orgánicos de *Teucrium buxifolium*: solución, a partes iguales, de CMC al 1% (p/v) y tween 80:agua (0.2:3.3) (v/v).

2.- Lote patrón que recibe la droga de referencia antiulcerosa, ranitidina a la dosis de 100mg/Kg, disuelta en el vehículo citado.

3.- Lote problema que se emplea para ensayar la actividad antiulcerosa del extracto hexánico, a la dosis antes referida y en el vehículo mencionado.

4.- Lote problema al que se administra el extracto metanólico, en las mismas condiciones que para el lote 3.

Debido a que el vehículo empleado para disolver el liofilizado de la infusión no coincide con el que disuelve los extractos orgánicos de la planta, se realizan experiencias paralelas en las que se establecen los lotes:

1'.- Lote control que recibe tan sólo agua corriente.

2'.- Lote patrón al que se administra ranitidina a la dosis de 100mg/Kg, disuelta en agua de la red.

3'.- Lote problema que recibe el liofilizado de la infusión, a la dosis a que se hace referencia.

A los 30 minutos de recibir el correspondiente tratamiento, se administra a todos los animales, también por vía oral, el agente ulcerogénico, indometacina, a una dosis de 50mg/Kg de peso, disuelta en agua.

Transcurrido un intervalo de 5 horas, se procede a sacrificar a los animales por guillotinado. Se sitúa al animal sobre una tablilla de disección e inmediatamente se realiza una laparatomía, abriendo el abdomen mediante una incisión sagital media. Se extrae el estómago, que es abierto, con unas finas tijeras, por la curvatura mayor y se lava el interior, con una corriente suave de agua o solución salina.

Los estómagos son extendidos sobre una tabla de corcho y sujetos mediante alfileres; se observan macroscópicamente las úlceras, que aparecen como puntos o líneas de color castaño oscuro, por la acción del jugo gástrico sobre la hemoglobina, procedente de las hemorragias ulcerosas. La valoración del grado de ulceración se realiza visualmente bajo lupa, midiéndose en milímetros la longitud de cada una de las lesiones y sumándose. Las úlceras puntiformes reciben el valor de 0.5mm. El recuento total en mm se expresa como grado de ulceración.

Se obtiene de esta forma un índice de ulceración máximo para los lotes 1 y 1', que no han recibido tratamiento alguno, tan sólo la sustancia de poder ulcerogénico, así como el grado de protección para los lotes patrón 2 y 2', y el grado de ulceración para los lotes que han recibido los tratamientos en ensayo.

Los resultados se expresan en porcentajes de inhibición respecto al índice de ulceración del lote control.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{IU_c - IU_p}{IU_c} * 100$$

IU_c : índice de ulceración del lote control

IU_p : índice de ulceración del lote problema o patrón

A partir de los índices de ulceración, pueden calcularse también los porcentajes de actividad de los lotes problema, con respecto al efecto del patrón, considerando a éste con actividad del 100%.

El análisis estadístico se realiza sometiendo los datos al 'test de Dunnett', calculando la media y error standard del grado de ulceración, para cada uno de los lotes y al test de la 'U de Mann-Whitney', para establecer el grado de significación estadística entre los grupos tratados y el control.

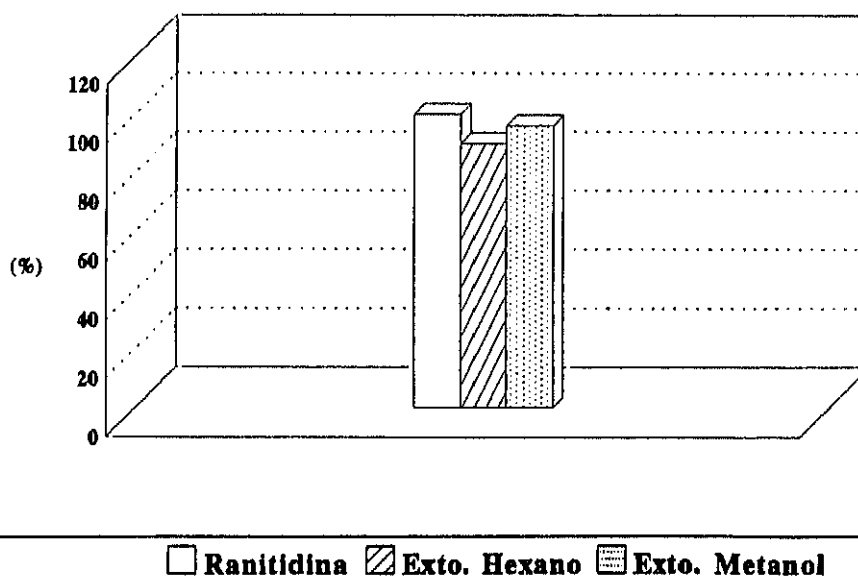
Resultados

Las tablas VII y VIII reflejan el valor de la media aritmética \pm error standard del correspondiente índice de ulceración ($IU \pm ES$), el porcentaje de inhibición (% Inhibición) con respecto al lote control y la actividad frente al patrón (% Act. Patrón). Las gráficas 5 y 6 representan los porcentajes de inhibición de la ulceración, para cada uno de los tratamientos.

ACTIVIDAD ANTIULCEROSA FRENTE A LAS ÚLCERAS INDUCIDAS POR INDOMETACINA			
Lote	IU \pm ES	% Inhibición	% Act. Patrón
Control	39.46 \pm 3.72	----	----
Ranitidina	0.11 \pm 0.07	99.72 %	100.00%
Exto. Hexánico	4.06 \pm 1.14	89.71 %	89.96 %
Exto. Metanólico	1.64 \pm 0.85	95.84 %	96.11 %

Tabla VII. Actividad antiulcerosa de los extractos hexánico y metanólico de la especie *Teucrium buxifolium*, frente a la inducción de úlceras por indometacina. $p < 0.001$ vs. control.

**ACTIVIDAD ANTIULCEROSA
FRENTE A LA INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA**
Extractos orgánicos de *Teucrium buxifolium*

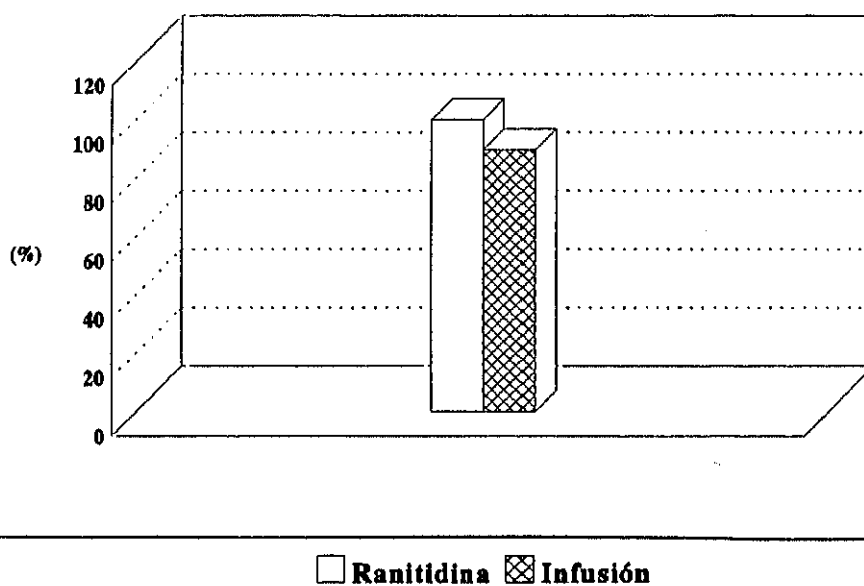


Gráfica 5.

ACTIVIDAD ANTIÚLCEROSA FRENTE A LAS ÚLCERAS INDUCIDAS POR INDOMETACINA			
Lote	IU \pm ES	% Inhibición	% Act. Patrón
Control	42.08 \pm 2.33	----	----
Ranitidina	0.06 \pm 0.06	99.87 %	100.00 %
Infusión	4.40 \pm 0.68	89.54 %	89.66 %

Tabla VIII. Actividad antiulcerosa del liofilizado de la infusión de la especie *Teucrium buxifolium*, frente a la inducción de úlceras por indometacina. $p < 0.001$ vs. control.

**ACTIVIDAD ANTIÚLCEROSA
FRENTE A LA INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA**
Liofilizado de la infusión de *Teucrium buxifolium*



Gráfica 6.

De los resultados obtenidos se puede deducir que, tanto los extractos hexánico y metanólico, como el liofilizado de la infusión de la especie *Teucrium buxifolium*, previenen, en todos los casos, la aparición de úlceras inducidas por indometacina, con elevados porcentajes de actividad del orden del 90%. El patrón empleado, ranitidina, ratificó su destacada potencia antiulcerosa, incluso superando el 99% de actividad inhibitoria del desarrollo de úlceras.

INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR ETANOL

Para la valoración de la capacidad citoprotectora de mucosa gastroduodenal se ha elegido un modelo experimental que consigue, mediante la aplicación de un agente necrosante, la inducción de úlceras por un mecanismo no dependiente de la secrección de jugo gástrico, por lo que permitirá evidenciar la posible potenciación de los mecanismos de defensa de la mucosa.

Entre los agentes necrosantes más utilizados, se encuentran los alcoholes concentrados, considerando a la inducción experimental de úlceras por etanol, el test más adecuado para valorar la actividad citoprotectora de mucosa [257].

Bases Patogénicas

La patogénesis provocada por el etanol es independiente del pH gástrico, y no afecta a la secrección ácida basal [307] por lo que la inhibición de la secrección péptica no protege del daño por etanol [322]. De hecho, no existe correlación entre el grado de lesión y el pH gástrico, incluso algunos animales presentan severas lesiones, al tiempo que mantienen un pH gástrico de 7-8 [307].

Los alcoholes presentan unas características de solubilidad que les permiten penetrar rápidamente a través de la mucosa gástrica, incrementan la fluidez de la membrana y la permeabilidad mucosal para iones y macromoléculas, así mismo, provocan retrodifusión ácida y aumento de Na^+ intraluminal [322].

El etanol es capaz de inhibir la síntesis de mucus y la secrección de bicarbonato, probablemente por inhibición directa de la anhidrasa carbónica [322]. De esta forma, el daño por etanol parece relacionarse con la reducción de los niveles mucosales de compuestos sulfhidrilos no proteicos [324].

A altas concentraciones, el alcohol promueve la solubilización del *mucus* superficial, deplección de la mucina intracelular, vertido de mucosustancias y bicarbonato y electrolitos al lumen. Provoca una rápida destrucción de las células epiteliales de la mucosa, con formación de áreas necróticas, por lo que se incrementa la absorción del alcohol y las macromoléculas permitiendo que la lesión profundice. La severidad de las lesiones por etanol es debida a la disrupción de la membrana de las células apicales y exfoliación celular, con exposición de la lámina propia en pocos minutos [322].

El etanol absoluto estabiliza la membrana lisosomal y se liberan enzimas lisosómicos y citosólicos, que potencian y exacerban el daño causado [322]. Incrementa la peroxidación lipídica y existe una clara implicación de radicales libres, como el superóxido. La mucosa gástrica es rica en xantina oxidasa, por lo que los RL podrían ser generados por acción de la XO sobre el acetaldehído formado localmente [218]. Aunque existen autores que indican que la lesión necrótica del etanol está mediada por neutrófilos y no implica RL [162].

Además, ejerce una acción dosis-dependiente en la microcirculación, que provoca la congestión e incremento de la permeabilidad vascular, ocasionando el estasis circulatorio, obstrucción y rotura de la pared vascular, con la consiguiente extravasación de eritrocitos que dan lugar a las hemorragias focales [323].

Las alteraciones en el flujo sanguíneo y la microvasculatura, a nivel gástrico, constituyen el elemento patogénico más temprano y a la vez más trascendental, en el desarrollo de las lesiones hemorrágicas de la mucosa. Estos cambios vasculares son los que conllevan la liberación de aminas vasoactivas, LT y PAF de las células mastocíticas, así como citokinas de las células endoteliales [322].

Por tanto, la acción necrosante del alcohol puede ser debida al efecto físico directo, ya que por su liposolubilidad penetran a mucosa fácilmente, provocando alteración metabólica, o bien, por modular indirectamente la

liberación de productos vasoactivos de células mastocíticas y otros tejidos o células sanguíneas [320].

Los mecanismos por los cuales se desarrolla citoprotección frente a las lesiones de mucosa gástrica, pueden englobar un incremento en la secreción de *mucus* y/o bicarbonato, fortalecimiento de la barrera mucosal, aumento del flujo sanguíneo en la mucosa gástrica, reducción de la motilidad, potenciación de la síntesis de PG y compuestos con restos sulfhidrilos, captación de RL, estimulación del crecimiento celular y mecanismos de reparación tisular, disminución en la liberación de LT...[31].

Como patrón de citoprotección se ha utilizado la atropina, ya que previene las úlceras provocadas por el etanol absoluto, en la misma medida que la PGE₂ [307], cuya actividad citoprotectora de mucosa gástrica ha sido suficientemente probada.

La atropina es efectiva, inhibiendo el daño inducido por etanol, a una dosis que no afecta a la secreción ácida basal, por lo que se deduce que ejerce un efecto citoprotector; es más, la atropina por vía iv, a dosis antisecretoras no previene la acción lesiva del etanol [307].

Protocolo Experimental

El modelo experimental de inducción de úlceras, elegido para el estudio del grado de citoprotección ejercido, emplea como agente necrosante el etanol absoluto [257]. El método, al no ser dependiente de la secreción de jugo gástrico, evaluará una actividad no debida a efectos antisecretores, sino potenciadores de los mecanismos de defensa.

Como animal de experimentación se eligen ratas Wistar hembra, de peso homogéneo 175 ± 25 g. Se distribuyen de forma aleatoria en lotes de seis individuos y son mantenidos en las ya citadas condiciones de estabulación convencional, los 2-3 días previos a las experiencias, en jaulas de rejilla metálica. Se someten a ayuno alimentario, con agua *ad libitum*, 24h antes de los ensayos.

Se estudia el grado de citoprotección de la mucosa gástrica de la infusión y extractos orgánicos de *Teucrium buxifolium* que han manifestado actividad antiinflamatoria, extracto hexánico y metanólico. La dosis empleada es equivalente a 12.5g de planta seca/Kg de peso de animal [364]. El fármaco de referencia, atropina, se administra a la dosis de 10mg/Kg.

Los tratamientos, incluido el patrón, se solubilizan o suspenden, en la proporción de 1mL/100g de peso de animal, para su administración oral mediante sonda esofágica.

De igual forma que en ensayos anteriores, el vehículo empleado para solubilizar los extractos no coincide con el que regenera el liofilizado de la infusión, que naturalmente es agua. Por ello, se establecen distintos lotes control y patrón según el vehículo utilizado, con el fin de comprobar que éste no ejerce influencia alguna en el tratamiento.

Por ello, los ensayos se realizan sobre los lotes de administración:

1.- Lote control que no recibe tratamiento y al que se administra el vehículo que suspende los extractos hexánico y metanólico de *Teucrium buxifolium*: solución al 1% de CMC (p/v) y tween 80:agua (0.2:3.3) (v/v), a partes iguales.

2.- Lote patrón al que se administra el fármaco citoprotector de referencia, atropina (10mg/Kg), disuelto en el vehículo anterior.

3.- Lote problema que recibe el extracto hexánico, a la dosis antes referida y en el vehículo mencionado.

4.- Lote problema al que se administra el extracto metanólico, en las mismas condiciones que para el lote 3.

Y en experiencias paralelas se establecen los lotes:

1'.- Lote control sin tratamiento que recibe sólo agua corriente.

2'.- Lote patrón al que se administra atropina *p.o.*, a la dosis de 10mg/Kg, disuelta en agua.

3'.- Lote problema que recibe el liofilizado de la infusión, regenerado en agua a la dosis referida.

Transcurridos 30 minutos, se administra, a todos y cada uno de los animales, el agente necrosante. La severidad de las úlceras es dependiente de la cantidad de alcohol, por lo que se realiza la administración de 1mL/animal de etanol absoluto (PANREAC), por vía oral. El alcohol provoca la necrosis tisular por desnaturalización de las proteínas de membrana, y posteriormente citosólicas. La zona antral aparece menos lesionada, con mayor afectación de la zona del *corpus*. La erosión de la membrana apical, con la consiguiente exfoliación, da lugar a lesiones sólo observables microscópicamente, produciendo también lesiones más profundas que afectan a la vascularización del territorio y se manifiestan de forma macroscópica como zonas hiperémicas, en forma de estrías hemorrágicas paralelas al eje longitudinal del estómago, de 1-10mm de longitud por 1-3mm de ancho.

Una hora después de la administración del etanol, se sacrifica a los animales mediante guillotina. En posición decúbito supino y sobre una tabla de disección, se procede a una laparatomía en el tercio anterior de la línea media abdominal. El estómago, una vez extraído, se abre por la curvatura mayor, lavando su interior con solución salina o bajo una corriente suave de agua. Los estómagos se extienden sobre una tabla de corcho, sujetos con alfileres y se procede a la cuantificación de las lesiones ulcerosas.

La valoración del grado de ulceración se realiza visualmente mediante la escala de Marhuenda [196]:

- 0 : No existen lesiones ulcerosas
- 1 : Úlceras hemorrágicas, finas y dispersas de longitud < 2mm
- 2 : Una úlcera hemorrágica y fina de longitud < 5mm
- 3 : Más de una úlcera de grado 2
- 4 : Una úlcera de longitud < 5mm y diámetro < 2mm
- 5 : De 1 a 3 úlceras de grado 4
- 6 : De 4 a 5 úlceras de grado 4
- 7 : Más de 6 úlceras de grado 4
- 8 : Lesiones generalizadas y hemorrágicas en toda la mucosa

El índice de ulceración máximo corresponderá a los lotes control, 1 y 1', en los que el agente necrosante por contacto ejerce su más alto poder ulcerogénico, ya que no reciben tratamiento alguno. Se obtiene así mismo el grado de ulceración para los lotes patrón 2 y 2', y para los lotes que han recibido los tratamientos objeto de estudio. De estos índices puede deducirse el nivel de protección alcanzado por cada uno de los distintos tratamientos, frente a las lesiones inducidas por etanol, expresado en porcentaje de inhibición respecto al índice de ulceración del lote control, de igual forma que en el modelo de inducción de úlceras por indometacina.

Se evalúa la actividad de los lotes problema frente al grado de citoprotección demostrado por el patrón, atropina, considerando la actividad de ésta como el 100%.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realiza calculando la media aritmética y el error standard, de los índices de ulceración de cada uno de los lotes, sometiendo los datos al 'test de Dunnett', y se establece si las diferencias halladas, entre los grupos tratados y el control, son estadísticamente significativas, mediante la 'U de Mann-Whitney'.

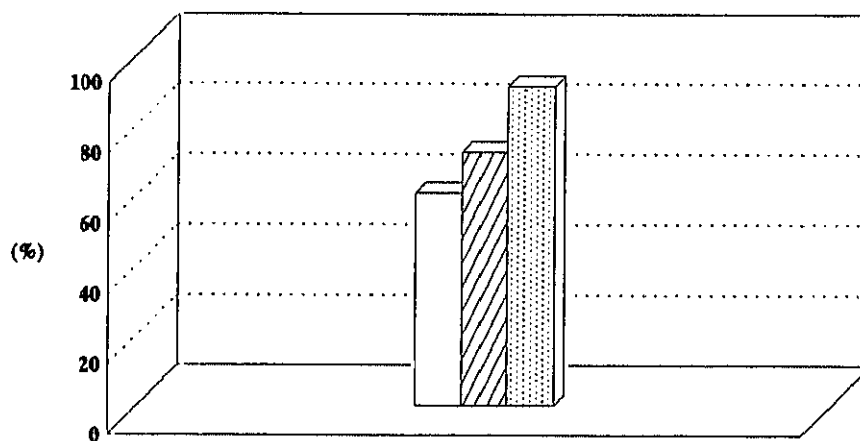
Resultados

Se refleja en las siguientes tablas (Tablas IX y X), para cada lote, el valor de la media aritmética \pm error standard del índice de ulceración - según la escala de Marhuenda [196]- ($IU \pm ES$), el grado de citoprotección (% Citoprotección) con respecto al lote control y la actividad frente al patrón (% Act. Patrón). En las gráficas 7 y 8 se reflejan la prevención de las lesiones ulcerosas por etanol, expresadas en porcentaje de actividad, para los extractos orgánicos (hexánico y metanólico), así como para el liofilizado de la infusión de la especie *Teucrium buxifolium*, respectivamente.

ACTIVIDAD CITOPROTECTORA FRENTE A LA INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR ETANOL			
Lote	IU \pm ES	% Citoprotección	% Act. Patrón
Control	7.17 \pm 0.31	----	----
Atropina	2.83 \pm 0.40	60.47 %	100.00 %
Exto. Hexánico	2.00 \pm 0.32*	72.09 %	119.22 %
Exto. Metanólico	0.67 \pm 0.21	90.70 %	149.98 %

Tabla IX. Actividad antiulcerosa de los extractos hexánico y metanólico de *Teucrium buxifolium*, frente a la inducción de úlceras por etanol. $p < 0.021$ * $p < 0.032$ vs. control.

**ACTIVIDAD CITOPROTECTORA DE MUCOSA GÁSTRICA
FRENTE A LA INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR ETANOL**
Extractos orgánicos de *Teucrium buxifolium*



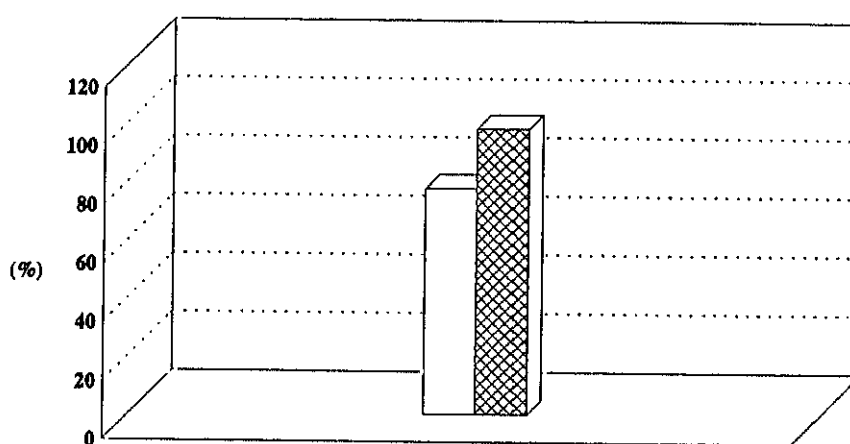
☐ Atropina
 ☒ Exto. Hexano
 ☒ Exto. Metanol

Gráfica 7.

ACTIVIDAD CITOPROTECTORA FRENTE A LA INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR ETANOL			
Lote	IU \pm ES	% Citoprotección	% Act. Patrón
Control	7.36 \pm 0.45	----	----
Atropina	1.70 \pm 0.40	76.91 %	100.00 %
Infusión	0.20 \pm 0.20	97.28 %	126.49 %

Tabla X. Actividad antiulcerosa del liofilizado de la infusión de la especie *Teucrium buxifolium*, frente a la inducción de úlceras por etanol. $p < 0.001$ vs. control.

**ACTIVIDAD CITOPROTECTORA DE MUCOSA GÁSTRICA
FRENTE A LA INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR ETANOL**
Liofilizado de la infusión de *Teucrium buxifolium*



□ Atropina ▨ Infusión

Gráfica 8.

Los extractos hexánico y metanólico, y el liofilizado de la infusión de *Teucrium buxifolium*, protegen frente al daño mucosal ejercido por el agente necrosante, etanol, con porcentajes de actividad superiores, en todos los casos, al patrón atropina. El extracto hexánico alcanza un grado de citoprotección por encima del 70%, siendo más activos el extracto metanólico de la especie y la infusión, con valores próximos o superiores al 90%.

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA Y CITOPROTECTORA

Es bien conocido, que la actividad de la mayoría de los antiinflamatorios generalmente empleados en terapéutica, se caracteriza por estar asociada a una serie de efectos secundarios, conocidos como gastropatía AINE. Los extractos hexánico y metanólico, y la infusión de la especie *Teucrium buxifolium* demostraron poseer una interesante actividad antiinflamatoria. Por ello el paso siguiente en su estudio farmacológico consistió en averiguar si, al igual que la mayoría de los AINE, presentaban capacidad ulcerogénica o bien si, por el contrario, gozaban de una actividad antiinflamatoria no ulcogénica. Dicha ulceración de la mucosa gástrica se sugiere que deriva del propio mecanismo de la acción antiinflamatoria, la inhibición de la síntesis de PGs, que provoca un desequilibrio entre los llamados factores agresivos y los protectores de la mucosa gastroduodenal, con aumento de la secrección gástrica y disminución del *mucus*.

En base a estos hechos, se abordaron dos modelos experimentales que permitiesen, por un lado valorar la actividad antiulcerosa y por otro, el posible grado de citoprotección de la mucosa gástrica, frente a un mecanismo inductor de lesiones ulcerosas no dependiente de la secrección de ácido.

En el modelo de inducción de úlceras por indometacina se ha escogido como patrón de referencia la ranitidina, potente antiulceroso antagonista de los receptores H_2 ; este fármaco inhibe la secrección gástrica, tanto estimulada como basal, reduciendo el volumen y contenido en ácido y pepsina de la secrección. En los ensayos realizados confirmó plenamente su potencia, con porcentajes de inhibición de las lesiones ulcerosas superiores al 99%, a la dosis de 100mg/Kg.

La atropina se ha empleado como fármaco patrón, frente al agente necrótico etanol, debido a ejercer un grado de citoprotección equiparable al de la PGE_2 [307]. En el citado protocolo experimental, se emplea a la dosis de 10mg/Kg, por lo que, al no ejercer, a esa dosis, acción alguna sobre la secrección gástrica, protege de las lesiones necróticas por un efecto citoprotector de la mucosa gastroduodenal. Alcanzó porcentajes de actividad entre el 60-76% aproximadamente, pero a pesar de ser un potente

citoprotector, no superó en ningún momento la actividad de la especie objeto de estudio.

El extracto hexánico de la especie *Teucrium buxifolium* se comporta como notable antiulceroso, protegiendo frente a las lesiones inducidas por la indometacina, con porcentajes de actividad cercanos al 90%. Ejerce además un grado de citoprotección del 72.09% con respecto a los lotes control, a los que no se administra tratamiento alguno, y del 119.22% con respecto al patrón empleado, considerando a éste con un 100% de actividad.

De igual forma, el extracto metanólico se define con una elevada potencia antiulcerosa, con un 95% de inhibición de las lesiones ulcerosas por indometacina, prácticamente equiparable al patrón, ranitidina. Así mismo, previene la aparición de úlceras inducidas por un agente necrosante, con un 90.70% de actividad citoprotectora de mucosa gástrica. Es posible que la excelente actividad que ostenta este extracto sea debida a la presencia en el mismo de compuestos de naturaleza flavónica, grupo químico frecuente en especies de este género [128] y que podría justificar el empleo de las mismas con carácter digestivo, ya que los derivados flavónicos han demostrado en renovadas ocasiones su actividad como agentes activos en el tratamiento de la úlcera [2,6,249,358,360].

La infusión de esta especie se comporta frente a las úlceras por indometacina de igual forma que el extracto hexánico, con una inhibición de las lesiones ulcerosas por indometacina del 89.54%. Resalta su actividad frente al agente necrosante etanol, con el grado de citoprotección más elevado de todos los tratamientos, del orden del 97%.

Los resultados obtenidos permiten concluir que, tanto los extractos hexánico y metanólico, como el liofilizado de la infusión de la especie *Teucrium buxifolium*, previenen la aparición de las úlceras inducidas por indometacina, potente inhibidor de la síntesis de PGs, con porcentajes de actividad próximos o superiores al 90%.

Así mismo, impiden el desarrollo de las lesiones necróticas, provocadas por la acción directa del etanol sobre la mucosa gástrica, probablemente debido a que ejercen un papel similar al del *mucus*, tapizando la superficie mucosal, por lo que se evita el contacto y penetración del etanol y por tanto, su acción lesiva. De hecho se postula esta hipótesis para compuestos de origen natural, como por ejemplo el β -sitosterol que protege frente a úlceras inducidas por ácidos fuertes, probablemente porque mantiene una hidrofobicidad en la superficie de la mucosa gástrica que protege frente al ácido luminal [262].

AISLAMIENTO DE PRINCIPIOS ACTIVOS

AISLAMIENTO DE PRINCIPIOS ACTIVOS

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	251
CONSIDERACIONES GENERALES	251
ENSAYOS PRELIMINARES: TLC	252
Optimización de Fases Móviles: Modelo PRISMA	253
CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CLC	257
Cromatografía Flash	259
Cromatografía Líquida de Media Presión: MPLC	260
MATERIAL Y MÉTODOS: FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE <i>Teucrium buxifolium</i>	265
CONDICIONES GENERALES	265
PROTOCOLO I.	267
Columna 1 y Seguimiento de la Actividad Antiinflamatoria	267
Columna 2 y Seguimiento de la Actividad Antiinflamatoria	268
Purificación Final: Fracción I.a y Fracción I.b	269
PROTOCOLO II	273
Ensayos preliminares	273
Columna 1 y Seguimiento de la Actividad Antiinflamatoria	275
Columna 2 y Seguimiento de la Actividad Antiinflamatoria	277
Columnas 3 a 5 (Fracción II.b) y Seguimiento de la Actividad Antiinflamatoria	278
Columnas 6 a 9 (Fracción II.a y II.c) y Seguimiento de la Act. Antiinflamatoria	282
ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO	287
 TÉCNICAS DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	 289
CONSIDERACIONES GENERALES	289
MATERIAL Y MÉTODOS: ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE FRACCIONES DE <i>Teucrium buxifolium</i>	293
EQUIPO INSTRUMENTAL	293
FRACCIONES I.a y II.a	293
FRACCIONES I.b y II.b	309
FRACCIÓN II.c	323
ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	337

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

CONSIDERACIONES GENERALES

Uno de los retos más importantes de la química actual es la separación de los componentes de mezclas; para ello, existen muy diversos métodos, algunos muy antiguos y usados desde siempre, incluso por los alquimistas, incluyendo cristalización, precipitación, sedimentación, extracción, filtración, destilación y adsorción. Aunque las propiedades de adsorción de diversos materiales eran ya explotadas, incluso por Aristóteles o Bacon, el desarrollo de las técnicas cromatográficas fue posterior y siempre apoyado en el avance experimentado por las ciencias químicas [204]. La cromatografía consiste en un proceso de separación de mezclas moleculares, por distribución de los solutos entre dos fases, las cuales están en contacto. La separación se basa en dos fenómenos físicos:

- **Adsorción:** se separan los diferentes compuestos de una mezcla por su velocidad de desplazamiento en un soporte, lo cual viene dado por la distinta afinidad que presentan por él.
- **Partición,** se separan los compuestos según su coeficiente de reparto, es decir, según su solubilidad en dos líquidos inmiscibles.

El problema de la separación de mezclas complejas reside en que, muchas veces, la afinidad que presentan cada uno de los elementos de la mezcla por las dos fases, inmiscibles entre sí, que componen el sistema cromatográfico, se halla en un rango tan estrecho que es precisa una enorme resolución.

El creciente interés que despierta la medicina tradicional, hace deseable el aislamiento de los principios responsables de la actividad atribuida. Es necesario, por ello, el uso de las técnicas cromatográficas para el aislamiento de sustancias puras, para su estudio estructural, bioensayos, tests farmacológicos, etc. En el caso de las muestras de origen natural, extremadamente complejas, se hace preciso un cuidadoso plan para

acometer la estrategia de separación de los principios activos, mediante el uso de técnicas de cromatografía preparativa.

El soporte más frecuentemente empleado para la separación de muestras complejas y extractos vegetales, con el fin de aislar productos naturales, es el Silicagel [141,204]. Pero también el gel de filtración Sephadex LH-20 desempeña un importante papel en el aislamiento de estos principios activos, consiguiendo la separación de compuestos en base a su peso molecular [141]. El Sephadex suele utilizarse para separar de las muestras aquellas sustancias de elevado peso molecular, e incluso poliméricas, que pueden enmascarar los verdaderos componentes activos. Se trata por tanto de un gel de filtración neutro hidrofílico, que separa por tamaño o peso molecular y no depende de intercambios iónicos [204].

La introducción de modernas técnicas de separación ha revolucionado la separación de productos naturales. Estos métodos permiten fraccionamientos, rápidos y de gran resolución, de mezclas complejas y frecuentemente, obviando los problemas que conlleva el aislamiento de compuestos más o menos lábiles. Las técnicas actuales de separación dependen de una serie de factores, a tener en cuenta a la hora de plantear la estrategia de aislamiento. La complementación de técnicas cromatográficas proporciona un incremento considerable del poder de resolución, constituyendo una herramienta de increíble utilidad en el caso de productos naturales. El número de posibles combinaciones de técnicas aumenta progresivamente, lo que hace suponer que, afortunadamente, se conseguirá cada vez una mayor simplicidad en los procesos de aislamiento.

ENSAYOS PRELIMINARES: TLC

La cromatografía en capa fina (TLC) constituye uno de los métodos más usualmente empleados, como ensayos preliminares de otras técnicas cromatográficas, en el aislamiento de principios naturales y aunque pueden extrapolarse los resultados obtenidos en cromatografía planar, a técnicas de cromatografía en columna (CLC), no hay que olvidar las limitaciones de la TLC, ya que ésta no constituye un sistema equilibrado con la fase móvil.

La elección de la fase móvil es crucial para el éxito del fraccionamiento y por ello es preciso recurrir a técnicas analíticas de TLC, fundamentadas en las series eluotrópicas de Trappe (modificada por Wren) y Stahl, o bien la clasificación de Snyder [304,305] que diferencia a los solventes en base a dos parámetros, polaridad y selectividad, en función de su momento dipolar, habilidad para donar/aceptar protones y capacidad de sufrir interacción dipolar [74]. Se establecen 8 clases de solventes de similar funcionalidad, que facilitan la elección de la fase móvil. Estos grupos poseen entre sí diferencias significativas de selectividad y pueden ser representados geométricamente en una figura triangular, en base a los parámetros de interacciones dipolares de cada solvente.

Optimización de Fases Móviles: Modelo PRISMA

Basado en el modelo triangular de selectividad de solventes de Snyder, se estableció el PRISMA, diseño geométrico para la optimización de fases móviles [221], de creciente uso en la actualidad, en TLC [220] y HPLC, aplicado al aislamiento de principios de origen natural [130,222], e incluso aminas biógenas [225,371].

El PRISMA consiste en un modelo tridimensional que permite la combinación de 4 solventes distintos -clasificados en los 8 grupos de Snyder- con el consiguiente incremento de selectividad otorgado por una fase móvil cuaternaria. En algunas ocasiones esta fase móvil puede llevar un quinto componente, llamado 'modificador', cuyo empleo se definirá más adelante. Uno de los solventes posee potencia cero o es inerte, y se emplea para equiparar la potencia del resto, por dilución, al de menor fuerza de solvencia. El modelo PRISMA puede ser empleado tanto en fase reversa [129,225,371] como normal [74,130], empleando como solventes inertes, bien el agua o bien el hexano, respectivamente.

El prisma se construye sobre una base triangular equilátera y cada uno de los vértices del triángulo representa un solvente y el resto de los puntos del mismo está formado por la combinación de los tres solventes, dos

de los cuales, los más potentes, estarán diluidos por el cuarto, el de potencia cero.

A partir de esta base se trazan las aristas del prisma, que representan la fuerza de solvencia de cada componente. Debido a que la potencia de cada solvente es distinta, la base del prisma nunca será paralela a la parte superior, por lo que se origina una pirámide truncada. Si se realiza una intersección en el prisma, a la altura de la arista más corta, ya que se igualan las potencias a la más baja, se obtiene un prisma regular. El prisma, así delineado, estará formado por infinidad de triángulos paralelos a la base; todos los puntos de cada uno de los platos triangulares comparten la misma fuerza de solvencia, mientras que ésta va aumentando progresivamente, en sentido ascendente. De esta forma, todo el prisma posee igual selectividad, no así igual potencia, que dependerá de la altura a la que se realice la intersección (Figura 45).

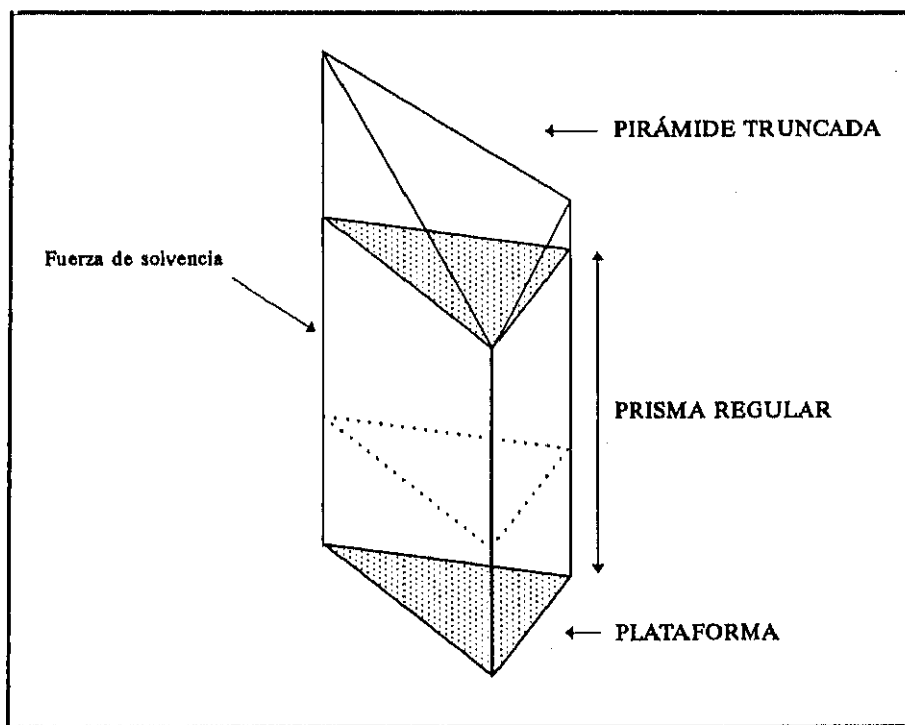


Figura 45. Diseño geométrico PRISMA, para la optimización de fases móviles

La figura geométrica del prisma, tal y como ha sido descrita, posee distintas zonas fácilmente diferenciables, que pueden representar las posibles aplicaciones de este modelo: plataforma, zona regular y pirámide truncada [74].

En cromatografía en fase normal, la pirámide irregular se emplea para la optimización de fases móviles para sustancias polares y semipolares. En este caso no es precisa la dilución de los solventes, y las variaciones en la fuerza de solvencia se realizan mediante la adición de agua, como solvente inerte, generalmente en igual porcentaje a los distintos componentes del prisma.

La zona del prisma regular permite establecer las condiciones de separación de compuestos apolares y semipolares, recurriendo al hexano como solvente de potencia nula, tal y como se ha definido anteriormente.

La parte inferior del prisma es conocida como 'plataforma' y representa al modificador (ácido acético, trietanolamina...), constituyendo éste el quinto posible componente de las fases móviles; puede ser añadido en una cantidad constante, para incrementar la fuerza de solvencia y/o eliminar el conocido efecto cola, en el desarrollo cromatográfico.

El modelo PRISMA proporciona no sólo una optimización de fases cuaternarias, sino también binarias (a lo largo de las aristas) y ternarias (en las caras del prisma) [221]. La mayor ventaja de este modelo estriba en que la optimización de la fase móvil puede realizarse de una forma sistemática, mediante sencillos cálculos matemáticos.

Para la optimización de la fase móvil según este modelo se seguirán una serie de pasos [221]:

1ª Etapa - Ajuste de la fuerza de solvencia: se realizan ensayos analíticos por TLC con los solventes puros de los 8 grupos clásicos, eligiendo, de entre ellos, los tres que mejor resolución ofrezcan, cuidando que al menos uno de ellos, sea capaz de arrastrar todo el depósito. Estos solventes deben hacer que el R_f de la sustancia a separar sea mayor de 0.8 [220]. Posteriormente, se equipara la potencia de los solventes por

dilución con el de fuerza de solvencia cero, si procede -es decir, en el caso de separaciones de compuestos apolares y semipolares -, hasta hacer que el R_f se encuentre en el intervalo 0.2 a 0.8. La composición de la fase móvil corresponderá al centro del triángulo superior del prisma regular, combinando 1/3 del solvente de menor potencia y 1/3 de cada uno de los otros dos solventes, ya diluidos con el solvente inerte.

2ª Etapa - Optimización de la selectividad de la fase móvil: una vez realizado el desarrollo cromatográfico, con la mezcla formada por el punto 333 del triángulo superior del prisma, se realizan las cromatografías en capa fina correspondientes a los puntos 118, 181 y 811 (Figura 46). La estimación visual, mediante los reactivos reveladores adecuados, de los resultados de los cuatro cromatogramas, servirá de guía para posteriores ensayos, alrededor del punto que proporcione una mejor separación. De esta forma, es necesario un número bastante limitado de desarrollos cromatográficos experimentales para alcanzar las condiciones óptimas.

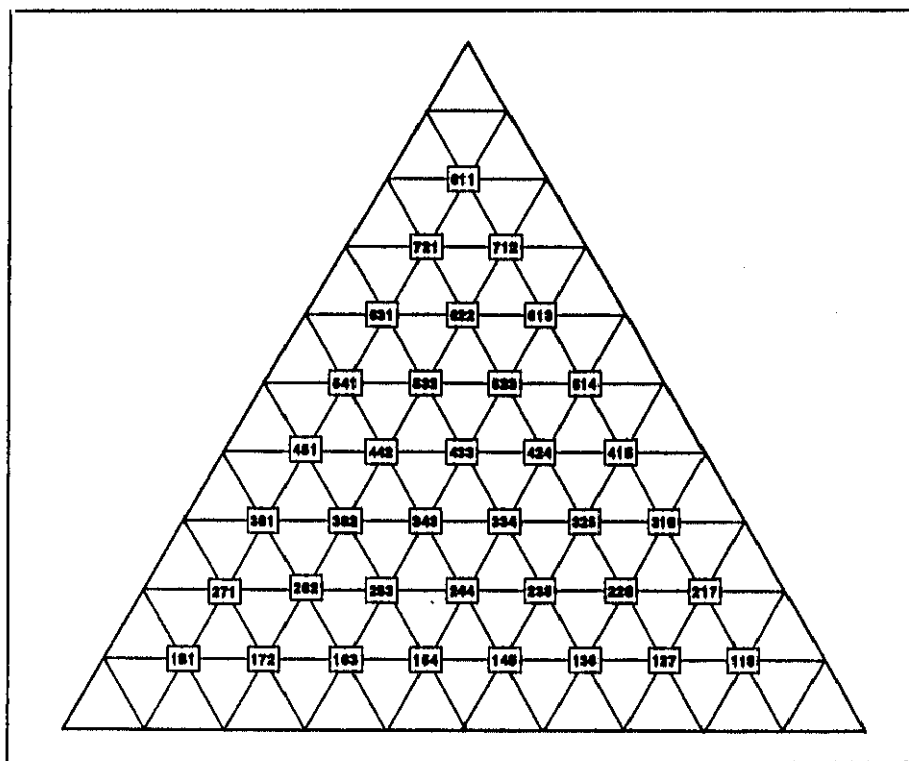


Figura 46. Diagrama de posibles combinaciones de los solventes en la optimización de fases móviles, modelo PRISMA

3a Etapa - Optimización final: en esta etapa la optimización está referida a la potencia de la fase móvil, ya que en ocasiones es preciso incrementarla, fundamentalmente si el tiempo de análisis es elevado; o bien disminuir dicha fuerza de solvencia, con desplazamientos verticales hacia la base inferior del prisma regular, mediante dilución de todos los solventes con el que es prácticamente inerte.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN COLUMNA: CLC

Las limitaciones de las técnicas clásicas de cromatografía en columna son bien conocidas, separaciones lentas que conlleva adsorción irreversible de la muestra, así como incompatibilidad con fases estacionarias de pequeño tamaño de partícula. Por ello, ha sido preciso el desarrollo de nuevas técnicas de CLC entre las que pueden citarse la columna en seco, con aplicación de vacío y técnicas de cromatografía líquida bajo presión.

Encuadradas en este apartado, se pueden citar a la CROMATOGRAFÍA FLASH y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE MEDIA PRESIÓN (MPLC):

Cromatografía Flash 2 bar / 30 psi
Baja presión (LPLC) < 5 bar / 75 psi
Media presión (MPLC) 5 - 20 bar / 75-300 psi
Alta presión (HPLC) > 20 bar / 300 psi

Los principales atributos de la cromatografía bajo condiciones de presión son su rapidez y alta resolución, que confieren a estas técnicas una elevada efectividad y rendimiento.

En todo proceso de fraccionamiento cromatográfico es imprescindible un estudio previo por TLC analítica, como se ha indicado, y es aconsejable sumarle una cromatografía en columna, también de tipo analítico, en la que se emplee una mínima cantidad de muestra, cuando esto sea posible, ya que permitirá una optimización de la técnica preparativa a seguir.

Existen varios factores y parámetros a tener en cuenta y en primer lugar, es preciso considerar que la muestra que va a ser sometida a fraccionamiento debe ser soluble en la fase móvil. Por otro lado, es de vital importancia para una buena separación, la preparación de la muestra, siendo prácticamente ineludible la filtración en el caso de la cromatografía en columna, con el fin de eliminar así el material insoluble en la fase móvil [141], ya que las precipitaciones en la cabeza de la columna pueden ser irremediables. Es importante que la solubilidad de la muestra en la fase móvil no limite la cantidad que pueda aplicarse a la columna. Si el volumen de muestra es muy grande, disminuye la eficacia de la separación y si por el contrario, está muy concentrada, podría precipitar en la columna.

La capacidad de carga de la columna dependerá del diámetro y longitud de la misma, tamaño de partícula del soporte y su densidad. La cantidad de muestra a separar depende, a su vez, de las dimensiones de la columna y del flujo de la fase móvil, parámetros frecuentemente incrementados a expensas de la pureza de las fracciones obtenidas. El aumento de la longitud y diámetro de la columna proporciona en una mayor resolución y permite la aplicación de mayor cantidad de muestra, pero no pueden ser aumentados estos parámetros de forma indefinida, debido a que el espesor de la pared de la columna habrá de poder resistir el aumento de presión.

La aplicación de presión proporciona un mayor flujo, separaciones más rápidas y empaquetado más perfecto del lecho o fase estacionaria y por tanto, mejor resolución.

La combinación de los parámetros tamaño de partícula del soporte, dimensiones de la columna y presión, permitirá aumentar la velocidad y resolución, pero en contrapartida se encarece el proceso, ya que el material es más caro y frágil y existe un elevado consumo de disolventes.

Cuando la separación es sencilla se recurre a los sistemas de baja presión, mientras que en las etapas de purificación en que la selectividad es elevada y ya no se requieren altas presiones, la Cromatografía Flash es la solución idónea. En la separación de constituyentes puros de origen natural es habitual la combinación de Cromatografía Flash y MPLC.

Cromatografía Flash

En 1978, Still y colaboradores [313] proponen una técnica de cromatografía en columna, que podría definirse como un híbrido entre media presión y cromatografía en columna corta, presentando la ventaja de una separación más rápida e indudablemente, se trata de una técnica de más bajo coste. En la cromatografía líquida en columna, además del largo tiempo de elución, hecho que ya puede considerarse como una desventaja, existen otros dos grandes inconvenientes, el riesgo de descomposición de componentes lábiles y la aparición de colas en las bandas de separación. Todo ello queda minimizado, casi subsanado, en la Cromatografía Flash [141].

Se elige la fase móvil que en TLC proporcione los mejores resultados y con un R_f de 0.35 aproximadamente, para la sustancia a aislar. El flujo de goteo suele ser de 2.0 ± 0.1 in/min = 50 mL/min, y el Silicagel de tamaño de partícula de $40-63 \mu\text{m}$ = 400-230 mesh. Se establecen las condiciones de trabajo, en función de una serie de parámetros: dimensiones de la columna, tamaño de muestra y de fracciones recogidas y volumen de fase móvil para el empaquetado y elución (Tabla XI). El tamaño de muestra es proporcional a las dimensiones de la columna y viceversa, pero aunque puede incrementarse el peso de la muestra, es a costa de un menor poder resolutivo.

Diámetro (mm)	Fase Móvil (mL)	Muestra (mg)		Fracciones (mL)
		$\Delta R_f \geq 0.2$	$\Delta R_f \geq 0.1$	
10	100	100	40	5
20	200	400	160	10
30	400	900	360	20
40	600	1600	600	30
50	1000	2500	1000	50

Tabla XI. Parámetros a tener en cuenta, al establecer las condiciones de trabajo en técnicas de Cromatografía Flash. Tomada de Still y cols. [313].

Las columnas poseen un cierre inferior con llave de goteo y un cierre hermético superior que se conecta a un propulsor de aire atmosférico. Se elige la columna apropiada y se rellena con aproximadamente 1cm de arena de mar lavada y el Silicagel, en seco, golpeando axialmente la columna para facilitar el empaquetado.

Generalmente, la altura del soporte será de cuatro veces el diámetro, o bien siguiendo una razón 1:30, 1:40 ó 1:60, muestra: Silicagel (p/p). Es opcional el incluir arena de mar en la parte superior de la columna, por encima de la fase estacionaria. Se humecta el lecho con la fase móvil, que es eluida gracias a la presión ejercida por el aire propulsado por la bomba o aireador, esto permite un perfecto empaquetado de la fase estacionaria. Es importante mantener la presión durante todo el proceso de humectación. A continuación, se añade la muestra, disuelta en la fase móvil y filtrada. Sobre la fase estacionaria se coloca una pequeña cantidad de lana de vidrio, material absolutamente inerte, que impide movimientos del Silicagel al añadir la fase móvil.

Las columnas, una vez utilizadas, es posible reciclarlas, previa limpieza del lecho, con el disolvente de mayor polaridad empleado en el fraccionamiento, generalmente acetona o metanol.

Esta técnica es de uso rutinario en muchos laboratorios, ya que permite separaciones rápidas, aunque con resolución moderada. Cuando es preciso un mayor poder resolutivo, se recurre a la combinación con otras técnicas cromatográficas y la Cromatografía Flash puede constituir el paso preliminar, e incluso usarse en las etapas finales de la purificación, ya que la selectividad es en estos casos muy elevada y no se requiere gran resolución.

Cromatografía Líquida de Media Presión: MPLC

Las técnicas de cromatografía líquida en columna bajo una presión de 5 a 20bar, fueron introducidas para subsanar uno de los grandes inconvenientes de técnicas de menor presión: la cantidad de muestra a fraccionar. En MPLC la muestra puede ser mucho mayor, con lo que disminuye el tiempo empleado en la separación, así como el coste al reducir el consumo de solventes. Actualmente, se emplea la cromatografía de media presión en combinación con otras técnicas, para el aislamiento de antibióticos [296], factores reguladores del crecimiento [19] y productos de origen natural [84].

Las técnicas de MPLC pueden ser un método complementario/suplementario de la cromatografía en columna abierta y Flash, con mayor resolución y menor tiempo de separación [141]. Por tanto, el empleo conjunto de Cromatografía Flash y MPLC proporciona un considerable ahorro del factor tiempo.

Existen en el mercado distintas posibilidades de equipo para MPLC, siendo Büchi y Labomatic los distribuidores más recurridos. El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en un equipo Labomatic, que consta de una bomba MD-80/100, capaz de proporcionar un flujo de 1-100 mL/min y presión sobre 12 bar o 1.56-156 mL/min a una presión superior a 18bar. Las pulsaciones se corrigen mediante el amortiguador MDP-20.

Las columnas de vidrio, además de ser químicamente inertes, facilitan la visualización de la efectividad del fraccionamiento y poseen una resistencia superior a los 20bar. Los extremos, cónicos, dificultan el proceso de llenado de la columna, pero permiten, en la etapa final del empaquetado, una mayor perfección del proceso.

Es necesario cuidar ciertos parámetros, para una óptima efectividad de la separación cromatográfica en MPLC, la elección de la fase móvil y su fuerza de solvencia, preparación y dimensiones de la columna, tamaño de partícula de la fase estacionaria, presión y flujo.

Existen diversas estrategias para transferir la fase móvil óptima en TLC a CLC, y más concretamente a MPLC; algunos autores estiman oportuno, previa a la cromatografía preparativa en MPLC, el uso de OPLC analítica, con optimización del solvente y condiciones empleadas [219].

Pueden seguirse distintos procedimientos de empaquetado de la fase estacionaria y no se recomienda compactar en húmedo, ya que la reproductibilidad es muy baja, pudiendo existir efectos cola. Además disminuye la resolución tras diferentes separaciones de la misma muestra, debido a desarrollos irregulares en la parte inferior de la columna, por contracción de la fase estacionaria.

Las técnicas de empaquetado en seco se pueden llevar a cabo aplicando presión por nitrógeno, o incluso conectando la columna a una bomba de vacío, con lo que se consigue una mayor densidad de compactación, incluso con Silicagel de tamaño de partícula relativamente pequeño, con gran homogeneidad de empaquetado entre las zonas superior e inferior de la columna [392]. El Silicagel de tamaño de partícula pequeño, 15 μ m, conlleva una disminución del ancho de las bandas de separación, con aumento de la resolución.

Es absolutamente imprescindible estabilizar/humectar la fase estacionaria con el eluyente seleccionado, durante varias horas (más de 3h), a un flujo constante, para eliminar las zonas de distorsión, difícilmente predecibles, por agua o aire adsorbido en el soporte. Puede ser recomendable secar previamente el Silicagel a 105°C, durante un período de 12h.

Las columnas son reciclables, sobre todo si se sigue un método de empaquetado en seco, aunque debe acondicionarse la columna tras varias separaciones repetidas, ya que progresivamente va aumentando el tiempo de retención y ésto influye de forma negativa en la resolución [392]. No sólo pueden reutilizarse las columnas cuando se trata de la misma muestra, para fraccionamientos repetitivos y/o consecutivos, aunque para ello es precisa una exhaustiva limpieza del lecho, para la que se aconseja el uso de solventes de polaridad decreciente: metanol \rightarrow acetato de etilo \rightarrow hexano [141]. De todas formas tienen una vida limitada, por lo que tras un cierto número de usos, el Silicagel debe ser repuesto.

Entre la fuerza de solvencia de la fase móvil y la resolución existe una relación inversamente proporcional, con lo que al disminuir la fuerza del solvente aumenta la resolución, pero se encarece el proceso, por incrementar el consumo de solventes. Si el hexano no influye en la selectividad de la fase móvil puede emplearse para disminuir la fuerza de solvencia, con lo que aumenta la resolución, y por otro lado, como la viscosidad también disminuye, puede incrementarse el flujo de elución.

De igual forma a mayor flujo, mayor gasto de solventes y menores tiempos de retención; aunque por encima de 6mL/min no varía el factor de retención, sin embargo, sí decrece la resolución y aparecen efectos cola y por encima de 10mL/min, la presión aumenta en exceso, por la fuerte compactación de la fase estacionaria.

La combinación de fuerza de solvencia relativamente pequeña, con alto flujo, permite minimizar el tiempo de separación, manteniendo una buena resolución, e incluso aumentando el tamaño de la muestra. La carga de muestra en la columna oscila entre 1-100mg extracto/g soporte y el equipo de Nyiredy considera óptimo el rango de 3-10mg extracto/g silicagel, ya que consigue una pureza $\geq 95\%$, para compuestos estrechamente relacionados [393].

La relación que existe, entre la cantidad de fase estacionaria y resolución, es lineal en columnas con igual diámetro interno y distinta longitud y viceversa, aunque en este último caso la relación guarda gran paralelismo con el eje X [393]. Por tanto, puede obtenerse mayor resolución al pasar de una columna corta y de gran diámetro a otra de mayor longitud y diámetro menor, con igual cantidad de fase estacionaria y muestra.

MATERIAL Y MÉTODOS

FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Teucrium buxifolium*

El estudio farmacológico de los usos medicinales de especies vegetales, alcanza su más amplio sentido al orientarse hacia la búsqueda de nuevos principios activos, de origen natural. Por un lado, es preciso comprobar científicamente la utilidad de las plantas usadas en la medicina tradicional, con el fin de ser incluidas en la flora medicinal ibérica, y por otro lado, es preciso justificar dichos usos, mediante el hallazgo de los componentes químicos responsables de sus acciones. Por ello, una vez corroborada la actividad antiinflamatoria y no ulcogena, de la especie *Teucrium buxifolium*, se procede al aislamiento de los principios activos de la misma. Se ha iniciado este proceso eligiendo para ello el extracto hexánico.

El género *Teucrium* goza de una gran riqueza en compuestos terpénicos, grupo químico al que pertenecen diversas estructuras, que han demostrado poseer actividad antiinflamatoria. Estos principios son fácilmente arrastrables por el hexano, hecho que podría justificar la inhibición del proceso inflamatorio, que el extracto de dicha naturaleza del *Teucrium buxifolium* demuestra, tanto en fase aguda como crónica. Esta actividad antiinflamatoria del extracto hexánico es notable y constante, a lo largo de todo el proceso, por lo que se procedió a su fraccionamiento cromatográfico, con el objetivo de aislar los principios activos, responsables de dicha acción farmacológica.

CONDICIONES GENERALES

El fraccionamiento cromatográfico progresivo se ha realizado mediante técnicas de separación en columna, bien por Cromatografía Flash o MPLC, usando como soporte Silicagel o Sephadex.

Previamente a las separaciones cromatográficas, se han realizado los ensayos de TLC precisos, para la elección de las fases móviles más

satisfactorias, empleando también esta técnica para el análisis de las sucesivas fracciones obtenidas.

La selección de fases móviles se ha realizado utilizando disolventes de las series eluotrópicas de Trappe (modificada por Wren) y Stahl [312]; así, se ha recurrido también a la optimización de fases móviles mediante el sistema PRISMA, propuesto por el grupo de Nyiredy [221].

Estos estudios se han llevado a cabo sobre cromatofolios de Silicagel, provistos de indicador de fluorescencia (SCHLEICHER & SCHUELL), siguiendo las técnicas sugeridas por Stahl [312], en las modalidades unidimensional y bidimensional ascendentes.

Las placas, una vez desarrolladas se dejan secar, realizando el revelado de los cromatofolios por observación a través de la luz UV y pulverización con un reactivo de carácter general, *oleum*, con posterior calentamiento de las placas a 120°C, durante 10 minutos.

Se reúnen, por similitud en su comportamiento en TLC, las diferentes fracciones obtenidas en el proceso de purificación cromatográfica en columna y se concentran en rotavapor, a vacío y temperatura controlada, nunca superior a 45°C; simultáneamente a la separación, con las fracciones cromatográficamente más interesantes, elegidas tanto por el aspecto de las placas reveladas, como por la cantidad disponible de las mismas, se realiza un seguimiento de la actividad antiinflamatoria. Para ello, se escoge el ya citado test del edema plantar por carragenina en ratones [315,383], obviamente ventajoso, al requerir cantidades de muestra de las fracciones a ensayar, claramente inferiores a las de otras pruebas farmacológicas, disolviendo las mismas en el vehículo empleado para los extractos de la especie. Las dosis de fracción se calculan en base a su rendimiento en la columna y a razón de 12.5g planta seca/Kg [364]. De entre dichas fracciones, se van escogiendo las de mayor poder inhibitorio del proceso inducido de inflamación, para proceder a la siguiente purificación, y así sucesivamente.

PROTOCOLO I

El extracto hexánico presenta graves problemas para su disolución, incluso en el disolvente en que fue obtenido, por ello se pensó que, al haber empleado un sistema de extracción en caliente, se habría arrastrado alguna sustancia, presumiblemente alguna macromolécula, que estaría interfiriendo en la solubilización y enmascarando los componentes activos. Esto sugería la posibilidad de emplear, como paso previo, el gel de filtración Sephadex LH-20-100, que al separar compuestos en base a su peso molecular [141,204], permitiría una primera purificación, facilitando así los procesos posteriores.

Se realizaron diversos ensayos, modificando diferentes parámetros, como las dimensiones de la columna, peso de la muestra y cantidad de fase estacionaria empleada; sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos, ya que la elución era muy rápida y de muy bajo poder resolutivo.

Desechada esta posibilidad, se inició la separación por medio de la técnica de cromatografía líquida en columna, tipo Flash, descrita por Still [313], utilizando en principio, el gel de sílice como fase estacionaria.

En la Columna 1, 12g del extracto hexánico fueron cromatografiados en una columna de $\phi=6.0749\text{cm}$ y $h=90\text{cm}$, utilizando como soporte 363g de Silicagel 60 [230-400 mesh, 40-63 μ] (MERCK). Como fase móvil se eligió Hexano/Acetato de Etilo (95:5), 2L y Acetato de Etilo, 750mL. Se obtuvieron 9 fracciones, seleccionando las 6 primeras para su estudio farmacológico, mediante el edema plantar por carragenina [315,383]. En la tabla XII se expresan los incrementos de volumen \pm error standard y los porcentajes de actividad inhibitoria del proceso inflamatorio. El grado de significación estadística se calcula mediante la 't de Student'.

Seguimiento de la actividad antiinflamatoria

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE AL EDEMA PLANTAR AGUDO			
AV \pm ES / Inhibición del edema plantar			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	0.20 \pm 0.005 ---	0.22 \pm 0.003 ---	0.24 \pm 0.005 ---
Fenilbutazona	0.12 \pm 0.005 40.00 %	0.08 \pm 0.013 63.64 %	0.07 \pm 0.005 70.83 %
Fracción 1	0.14 \pm 0.004 30.00 %	0.10 \pm 0.007 54.55 %	0.07 \pm 0.014 70.83 %
Fracción 2	0.12 \pm 0.004 40.00 %	0.09 \pm 0.005 59.09 %	0.06 \pm 0.008 75.00 %
Fracción 3	0.17 \pm 0.006* 15.00 %	0.11 \pm 0.004 50.00 %	0.09 \pm 0.006 62.50 %
Fracción 4	0.11 \pm 0.007 45.00 %	0.06 \pm 0.004 72.73 %	0.05 \pm 0.003 79.17 %
Fracción 5	0.12 \pm 0.007 40.00 %	0.09 \pm 0.004 59.09 %	0.06 \pm 0.004 75.00 %
Fracción 6	0.12 \pm 0.005 40.00 %	0.11 \pm 0.005 50.00 %	0.09 \pm 0.006 62.50 %

Tabla XII. Actividad antiinflamatoria de la fracciones de la columna 1 del Protocolo I, frente al edema plantar por carragenina. $p < 0.01$ * $p < 0.05$ vs. control.

De entre las fracciones más activas se eligió la cuarta para proseguir la purificación, utilizando en la Columna 2 como soporte, Sephadex LH-20-100 (FLUKA), y como fase móvil Metanol. Se realizó el empaquetado de la columna en húmedo y el flujo de la columna se mantuvo gracias a un embudo de carga de 500mL (POBEL). Se reunieron las fracciones en un total de 3, que fueron ensayadas en el test antiinflamatorio del edema plantar por carragenina, tabla XIII.

Seguimiento de la actividad antiinflamatoria

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE AL EDEMA PLANTAR AGUDO			
AV \pm ES / Inhibición del edema plantar			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	0.17 \pm 0.008 ---	0.21 \pm 0.005 ---	0.21 \pm 0.005 ---
Fenilbutazona	0.12 \pm 0.007 29.41 %	0.09 \pm 0.005 57.14 %	0.07 \pm 0.008 66.67 %
Fracción 4.1	0.18 \pm 0.007* (-)	0.14 \pm 0.008 33.33 %	0.12 \pm 0.007 42.86 %
Fracción 4.2	0.16 \pm 0.006* 5.88 %	0.10 \pm 0.004 42.86 %	0.11 \pm 0.005 47.62 %
Fracción 4.3	0.12 \pm 0.004 29.41 %	0.10 \pm 0.004 52.38 %	0.07 \pm 0.008 66.67 %

Tabla XIII. Actividad antiinflamatoria de las fracciones de la columna 2, Protocolo I, frente al edema plantar por carragenina. $p < 0.01$ * no significativo vs. control.

La fracción 4.3 fue la que presentó mayor actividad y pureza, con un comportamiento muy similar al del fármaco de referencia.

Purificación Final

Se abordó la purificación de la fracción 4.3 empleando de nuevo Sephadex (49.5g), como fase estacionaria, en una columna de $\phi=2.605\text{cm}$ y Metanol como eluyente. Se obtienen 3 fracciones. Por su pureza, y mayor concentración en dos manchas concretas, que aparecen con buena separación en TLC, fundamentalmente en la fase móvil Diclorometano/Acetato de Etilo (95:5), se selecciona la segunda fracción para proseguir el proceso, mediante sucesivas purificaciones en la misma columna, recogiendo siempre la fracción segunda de dichas columnas y desechando el resto.

En dicha fracción, se observa la aparición de cristales, en las paredes de los tubos de ensayo en que se recogen las fracciones.

Posteriormente, se somete a purificación en Silicagel 60 (27.4g), empleando como fase móvil Hexano/Acetato de Etilo (80:20), y a continuación en una columna de pequeño diámetro ($\phi=1.10\text{cm}$, 3.68g de Silicagel 60), eluida con Diclorometano/Acetato de Etilo (95:5). Se recogen tres fracciones, apareciendo cristalización en la tercera. Por su gran pureza, son muy interesantes las fracciones 2a y 3a, que son sometidas a nueva purificación.

La fracción 2a se purifica en columna de Silicagel 60, con Diclorometano/Acetato de Etilo (97:3) como fase móvil, obteniendo una fracción de elevada pureza, que presenta en TLC una sola mancha. Posteriormente, fue aislado un compuesto de este mismo extracto, según el Protocolo II, que presenta el mismo aspecto cromatográfico. Esta fracción recibe el nombre de Fracción I.a.

La fracción 3a anteriormente citada, se purifica en columna de Silicagel 60, eluyendo con Diclorometano/Acetato de Etilo, variando la proporción: (95:5), 100mL; (85:15), 200mL; (70:30), 100mL. Se obtiene un producto aislado de gran pureza, que cristaliza espontáneamente, por lo que se somete a las técnicas precisas de elucidación estructural. A esta fracción de alta pureza se le llamó Fracción I.b.

PROTOCOLO I

Extracto hexano

COLUMNA 1 Flash

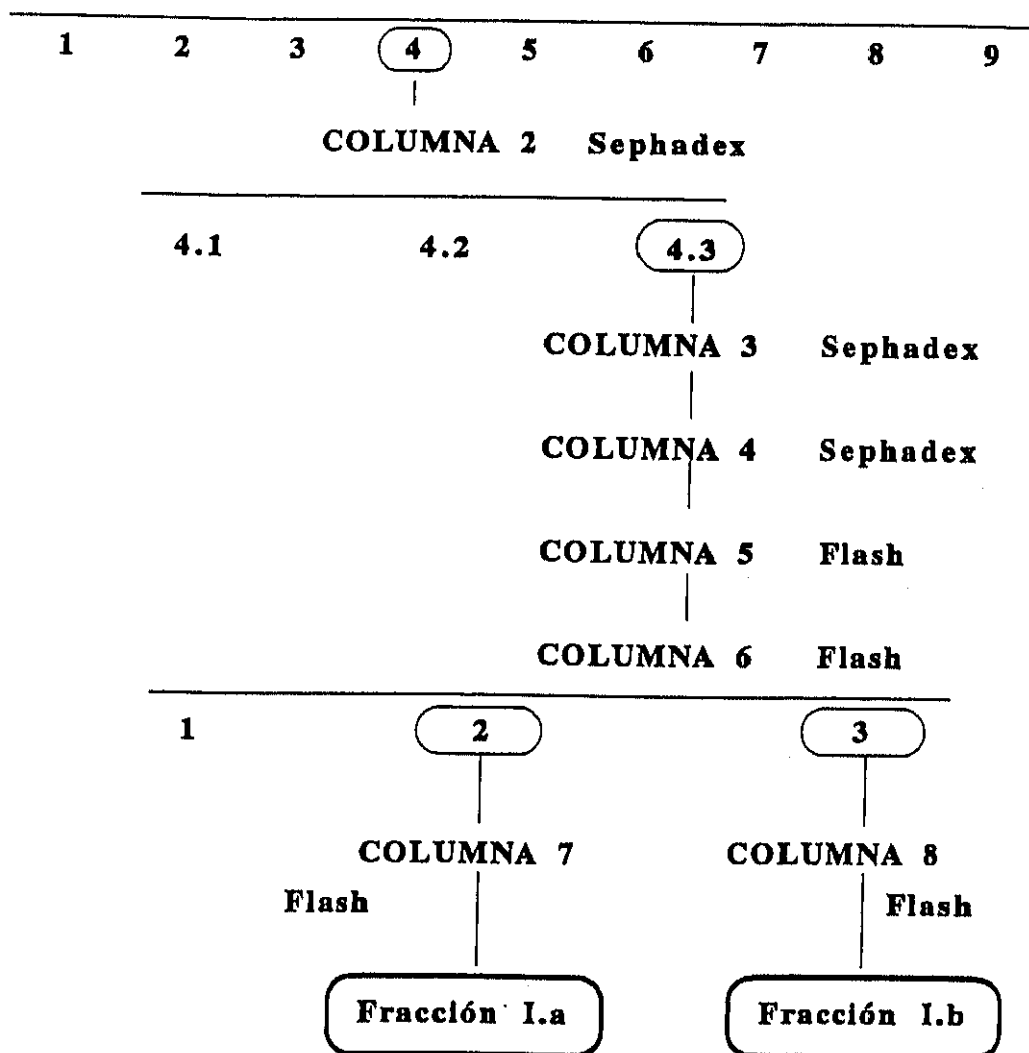


Figura 47. Fraccionamiento del Extracto Hexánico de *Teucrium buxifolium*

Esquema del Protocolo I

PROTOCOLO II

Las fracciones de gran pureza, I.a y I.b, obtenidas mediante el anterior protocolo de separación cromatográfica, podrían ser responsables, al menos en parte, de la actividad antiinflamatoria que presenta el extracto hexánico. Pero, aunque mediante dicho fraccionamiento se llega al aislamiento de productos, potencialmente interesantes, el desarrollo es largo y tedioso. La solubilidad del extracto hexánico y sus fracciones, en las distintas fases móviles seleccionadas no es total, precipitando en parte, lo que ocasiona una importante pérdida de producto. Era preciso obtener mayor cantidad de los compuestos aislados, para ello habría que repetir el proceso de separación, pero se planteó la necesidad de abordar el fraccionamiento cromatográfico siguiendo un desarrollo nuevo, con el fin de minimizar los inconvenientes, fundamentalmente de solubilidad de la muestra madre.

Ensayos preliminares

En principio, se optó por una separación, utilizando como fases móviles sucesivas: Benceno y Benceno/Acetona (75:25), (50:50), (25:75), finalizando con Acetona. La resolución alcanzada no fue demasiado buena, las fracciones obtenidas presentaban entre sí gran similitud, por lo que se reunieron en un total de 4. Además, Las tres primeras demostraron una misma potencia antiinflamatoria, prácticamente igual a la del extracto hexánico, por lo que se pensó que la separación no era satisfactoria.

Sin embargo, no se abandonó la composición de la fase móvil, Benceno/Acetona, aunque se variaron las proporciones, ya que los resultados en TLC eran muy interesantes, obteniendo finalmente 10 fracciones, de las que, una vez realizado el seguimiento farmacológico, se eligen las fracciones 4 y 5, para proseguir el fraccionamiento de las mismas de forma simultánea. Se llevó a cabo mediante una purificación, por un lado en lecho de Sephadex y por otro, en Silicagel, realizando los ensayos preliminares precisos para establecer las condiciones óptimas, en cuanto a tamaño de muestra y diámetro de la columna. Los rendimientos obtenidos eran siempre

bajos, aunque se lograron fracciones con muy buena actividad antiinflamatoria y comportamiento cromatográfico análogo al de las fracciones I.a y I.b, aunque con impurezas.

Estas fracciones similares a I.a y I.b se reservan, ya que se inició una nueva separación, en la que se partió del siguiente planteamiento: el abundante precipitado que se obtiene al disolver el extracto hexánico en benceno, presenta aspecto, desarrollo y comportamiento cromatográfico en TLC, totalmente idénticos al del extracto hexánico. Dicho precipitado es posible redisolverlo en el solvente en que precipita, siempre y cuando se haga en un volumen adecuado. De igual forma, es posible la total solubilización del extracto, pero empleando para ello un mayor volumen de solvente. Esto sugiere que probablemente la precipitación sea debida a una saturación, problema que surge en la cromatografía Flash, ya que la muestra de la columna no debe ser de gran volumen, condicionando así la solubilidad.

Sí fuera posible cargar las columnas de cromatografía con un mayor volumen de muestra, los rendimientos de las fracciones serían mejores. Por ello, y con el fin de optimizar el proceso de fraccionamiento cromatográfico, se recurrió a la combinación de las técnicas de Cromatografía Flash con MPLC, ya que la muestra que se puede fraccionar mediante esta técnica cromatográfica es algo mayor, solucionando en este caso el problema de saturación, que hasta el momento había condicionado los procesos de fraccionamiento. De esta forma, al poder introducir una muestra mayor en las columnas, aumentará el rendimiento de las fracciones y se optimizará también la resolución.

Esta nueva estrategia de separación abordada proporcionó tres fracciones de alta pureza con rendimientos aceptables, que se someterán a elucidación estructural, por lo que puede concluirse que el proceso de fraccionamiento es adecuado y sus condiciones son óptimas y totalmente reproducibles, por ello la exposición del proceso se hará de forma detallada, indicando dimensiones de las columnas, consumo de fases móviles, peso de muestra...

Columna 1

Muestra: Extracto hexánico y precipitado obtenido en otros fraccionamientos, al disolver dicho extracto en benceno, 13g

Dimensiones de la columna: \varnothing =7.4cm, capacidad=2460mL

Soporte: Silicagel 60 A CC [< 325 mesh, 20-45 μ] (SDS), 1160g

Fase móvil: Benceno 6L, Benceno/Acetona (98:2) 3L, (95:5) 5L, (50:50) 5L, Acetona 2L.

Condiciones: Se ha empleado un equipo Labomatic de Cromatografía Líquida de Media Presión de bomba MD-80/100 y amortiguador MDP-20. El empaquetado se realizó en seco y posteriormente, se humectó el adsorbente, haciendo pasar el primer eluyente durante varias horas, para estabilizar la columna. La muestra se disuelve en benceno, se filtra a vacío y se carga en la columna, bajo presión de 2-4 bares, gracias a una válvula inyectora. El sistema de carga de la columna permite que se opere con un volumen de muestra mayor que para la Cromatografía Flash, hecho muy ventajoso con respecto al material objeto de estudio, que presenta problemas de solubilidad, probablemente debidos a sobresaturación. Se trabajó a un flujo de 15mL/min, recogiendo fracciones de 200mL en el colector del equipo. Las fracciones se reúnen por similitud entre sí, en un total de 8, de las que se estudió la actividad antiinflamatoria, excepto de la última, ya que no parecía de interés, por su aspecto en TLC. La columna se limpió con Acetona y finalmente con Metanol, con el fin de ser reciclada.

Seguimiento de la actividad antiinflamatoria

El estudio de la actividad antiinflamatoria de las fracciones se realiza siguiendo el modelo experimental de edema plantar, descrito por Winter [383] y modificado para ratones por Sugishita [315]. En la Tabla XIV quedan reflejados los incrementos de volumen plantar \pm error standard y la actividad inhibitoria del proceso edematoso de las distintas fracciones y del lote patrón al que se administra el fármaco de referencia, fenilbutazona 80mg/Kg.

El análisis estadístico de los resultados se realiza sometiendo los datos al test de la 't de Student', para establecer el nivel de significación estadística.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE AL EDEMA PLANTAR AGUDO			
AV \pm ES / Inhibición del edema plantar			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	0.19 \pm 0.004 ---	0.22 \pm 0.009 ---	0.19 \pm 0.005 ---
Fenilbutazona	0.11 \pm 0.007 42.11 %	0.09 \pm 0.010 59.09 %	0.08 \pm 0.008 57.89 %
Fracción 1	0.03 \pm 0.005 84.21 %	0.05 \pm 0.005 72.27 %	0.09 \pm 0.005 52.63 %
Fracción 2	0.06 \pm 0.007 68.42 %	0.08 \pm 0.012 63.64 %	0.09 \pm 0.012 52.63 %
Fracción 3	0.03 \pm 0.005 84.21 %	0.04 \pm 0.014 81.82 %	0.08 \pm 0.014 57.89 %
Fracción 4	0.06 \pm 0.012 68.42 %	0.04 \pm 0.010 81.82 %	0.07 \pm 0.015 63.16 %
Fracción 5	0.06 \pm 0.008 68.42 %	0.11 \pm 0.013 50.00 %	0.11 \pm 0.013 42.11 %
Fracción 6	0.11 \pm 0.015 42.11 %	0.08 \pm 0.007 63.64 %	0.15 \pm 0.010 21.05 %
Fracción 7	0.01 \pm 0.005 94.74 %	0.04 \pm 0.014 60.87 %	0.11 \pm 0.019 42.11 %

Tabla XIV. Actividad antiinflamatoria de las fracciones de la columna 1 del Protocolo II, frente al edema plantar por carragenina. $p < 0.01$ vs. control.

Se observó una elevada actividad antiinflamatoria por parte de todas las fracciones, fundamentalmente a las 3 y 5 horas de la administración de carragenina, con descenso en los porcentajes de inhibición a las 7 horas, incluso para la fenilbutazona. De estas fracciones, la 4 destaca por su constante potencia, que se mantiene incluso al final del proceso, superando en todo momento al fármaco de referencia. Esta fracción es quizá la que manifiesta en capa fina mayor complejidad, coincidiendo algunas de sus manchas, con aquellas que corresponden a los cristales observados en fracciones obtenidas en el Protocolo I. Por ello, se seleccionó para su posterior purificación. Otras fracciones podrían ser interesantes, por su elevadísima actividad antiinflamatoria, pero de las que se obtuvieron rendimientos más bajos que en el caso de la fracción 4.

Columna 2

Muestra: Fracción 4 de la columna anterior, 4.5g

Dimensiones de la columna: $\phi=7.4\text{cm}$, capacidad=2460mL

Soporte: Silicagel 60 A CC [< 325 mesh, 20-45 μ] (SDS), 1160g

Fase móvil: Benceno/Acetona (98:2) 7L, Acetona 2.5L.

Condiciones: Técnica MPLC. Se recicló la columna anterior, pasando la fase móvil correspondiente durante varias horas, para estabilizar la columna. Se opera con la muestra de igual forma que para la columna anterior, pero disolviéndose en el eluyente correspondiente. Con un flujo de 15mL/min, se recogieron en el colector fracciones de 200mL. Se reúnen 6 fracciones. Las cuatro primeras manifiestan un comportamiento y pureza en TLC realmente interesante. Concretamente la fracción cuarta, presenta un aspecto prácticamente idéntico al de la fracción I.b y similares.

Seguimiento de la actividad antiinflamatoria

Se ensayó la actividad antiinflamatoria de las cuatro primeras fracciones, obteniendo los siguientes resultados de incrementos de volumen plantar \pm error standard y de actividad inhibitoria del proceso de inflamación (Tabla XV). La significación estadística se calcula mediante el test de la 't de Student'.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE AL EDEMA PLANTAR AGUDO			
AV \pm ES / Inhibición del edema plantar			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	0.18 \pm 0.009 ---	0.20 \pm 0.012 ---	0.18 \pm 0.006 ---
Fenilbutazona	0.11 \pm 0.008 38.89 %	0.08 \pm 0.009 60.00 %	0.08 \pm 0.007 55.56 %
Fracción 4.1	0.10 \pm 0.009 44.44 %	0.12 \pm 0.007 40.00 %	0.12 \pm 0.007 33.33 %
Fracción 4.2	0.07 \pm 0.005 61.11 %	0.06 \pm 0.008 70.00 %	0.07 \pm 0.013 61.11 %
Fracción 4.3	0.08 \pm 0.009 55.56 %	0.09 \pm 0.014 55.00 %	0.09 \pm 0.014 50.00 %
Fracción 4.4	0.07 \pm 0.008 61.11 %	0.06 \pm 0.006 70.00 %	0.06 \pm 0.007 66.67 %

Tabla XV. Actividad antiinflamatoria de las fracciones de la columna 2, frente al edema plantar por carragenina. $p < 0.01$ vs. control.

La fracción 4.1 presentó porcentajes de inhibición del edema plantar próximos al 40%, siendo la que presentó la menor actividad. Mientras que la 4.3 se mantuvo alrededor del 50 %, las fracciones 4.2 y 4.4 fueron las más potentes, superando la actividad de la fenilbutazona, y destacando la 4.4 como la más activa. Se prosigue la purificación con las fracciones 4.2, 4.3 y 4.4.

Columna 3

Muestra: Fracción 4.2 de la columna anterior, 1g y 900mg de la fracciones similares a I.a, reservadas hasta el momento.

Dimensiones de la columna: $\phi=3.7$ cm, capacidad=615mL

Soporte: Silicagel 60 A CC [< 325 mesh, 20-45 μ] (SDS), 293.5g

Fase móvil: Tolueno 1L, Tolueno/Acetona (99:1) 3L, Acetona 1L.

Condiciones: Equipo de MPLC Labomatic. La muestra, una vez disuelta en tolueno, fue filtrada a vacío. Las fracciones de 25 mL, fueron recogidas a un flujo de 15 mL/min y unidas por similitud, en un total de 5. Se estudió

la actividad de la 2a y 5a (4.2.2 y 4.2.5) junto con otras fracciones de las columnas 4 y 5, que serán comentadas a continuación.

Columna 4

Muestra: Fracción 4.3 de la columna 2 de este Protocolo, 1.764g y 646mg de fracciones cromatográficamente similares, de fraccionamientos anteriores.

Dimensiones de la columna: $\phi=3.7\text{cm}$, capacidad=615mL

Soporte: Silicagel 60 A CC [< 325 mesh, $20-45\ \mu$] (SDS), 293.5g

Fase móvil: Hexano/Acetato de Etilo/Acetona (85:5:10) 3.7L, Acetona 1L.

Condiciones: Técnica MPLC. La columna se recicló de la anterior, pero hubo que regenerar la cabeza de la misma porque se había desactivado. La muestra se disolvió en hexano y se filtró por pliegues. A un flujo de 15mL/min, se recogen fracciones de 25mL, que se reúnen en 6. La más interesante fue la 2a (4.3.2), por lo que se ensayó la actividad antiinflamatoria de la misma.

Columna 5

Muestra: Fracción 4.4 de la columna 2 de este Protocolo II, 372.5mg; fracciones similares a I.b, 475mg. Estas fracciones presentan cristalización, en forma de acículas, con un desarrollo cromatográfico similar, y una mancha común entre ellas e idéntica a la de los cristales de la fracción I.b.

Dimensiones de la columna: $\phi=2.605\text{cm}$ y $h=50\text{cm}$

Soporte: Silicagel 60 [230-400 mesh, $40-63\ \mu$] (MERCK), 47g

Fase móvil: Hexano/Acetato de etilo/Acetona (85:5:10) 1L, Acetona 150mL.

Condiciones: Se empleó la técnica de Cromatografía Flash. La altura del adsorbente en la columna alcanzó 16.7cm. Se obtienen 7 fracciones, de las cuales la 3a y 4a cristalizan espontáneamente. De la fracción 3a, tras cristalización y lavado de los cristales se obtiene un producto de elevada

pureza, en forma de escamas de color blanco perlado que recuerda en parte a la micacita. Recibe el nombre de Fracción II.b, por ser idéntica a la I.b.

Esta Fracción II.b se somete a las técnicas de elucidación estructural pertinentes, coincidiendo los datos espectroscópicos con los obtenidos para la fracción I.b. El seguimiento de la actividad de las fracciones se realizó sobre las fracciones 2a y 4a (4.4.2 y 4.4.4), así como sobre las aguas madre de la cristalización de la fracción 3a (4.4.3c).

Seguimiento de la actividad antiinflamatoria

De nuevo se elige el modelo experimental de edema plantar agudo en ratones [315,383]. La Tabla XVI refleja los incrementos de volumen plantar y su error standard y la actividad antiinflamatoria en porcentajes de inhibición del proceso, para cada una de las fracciones citadas de las columnas 3, 4 y 5 de este Protocolo. Mediante la 't de Student' se establece el grado de significación estadística y se calcula el error y desviaciones standard.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE AL EDEMA PLANTAR AGUDO			
AV \pm ES / Inhibición del edema plantar			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	0.21 \pm 0.008 ---	0.24 \pm 0.012 ---	0.20 \pm 0.018 ---
Fenilbutazona	0.12 \pm 0.006 42.86 %	0.08 \pm 0.006 66.67 %	0.07 \pm 0.007 65.00 %
Fracción 4.2.2 columna 3	0.10 \pm 0.007 52.38 %	0.12 \pm 0.012 50.00 %	0.08 \pm 0.007 60.00 %
Fracción 4.2.5 columna 3	0.12 \pm 0.011 42.86 %	0.11 \pm 0.006 54.17 %	0.12 \pm 0.008 40.00 %
Fracción 4.3.2 columna 4	0.07 \pm 0.006 66.67 %	0.05 \pm 0.006 79.17 %	0.05 \pm 0.010 75.00 %
Fracción 4.4.2 columna 5	0.08 \pm 0.007 61.90 %	0.07 \pm 0.007 70.83 %	0.06 \pm 0.009 70.00 %
Fracción 4.4.3c columna 5	0.08 \pm 0.006 61.90 %	0.06 \pm 0.009 75.00 %	0.07 \pm 0.007 65.00 %
Fracción 4.4.4 columna 5	0.07 \pm 0.004 66.67 %	0.08 \pm 0.011 66.67 %	0.10 \pm 0.010 50.00 %

Tabla XVI. Actividad antiinflamatoria de fracciones de las columnas 3, 4 y 5, frente al edema por carragenina. $p < 0.01$ vs. control.

Como era de esperar en este grado de purificación y dada la actividad de las fracciones de las que proceden, los lotes problema presentaron una actividad antiinflamatoria satisfactoria. La fracción 4.2.5 presentaba en TLC una gran pureza, con una mancha definida de tonalidad verdosa, pero su actividad no parece demasiado interesante, al menos en comparación con otras fracciones.

Las fracciones 4.2.2 y 4.3.2, manifiestan gran potencia antiinflamatoria, por lo que se seleccionan para continuar la purificación mediante las siguientes columnas, 6-7 y 8-9 respectivamente, comentadas a continuación.

Con respecto a las fracciones ensayadas de la columna 5, queda patente la importante actividad antiinflamatoria de la fracción 4.4.2 y de las aguas madre de la cristalización de 4.4.3, probablemente debida a un mismo compuesto presente en ambas fracciones, correspondiente a la mancha que

poseen en común y que, obviamente, es de mayor pureza en la fracción cristalizada 4.4.3 -a la que se ha dado el nombre de II.b-, por lo que se procedió a su elucidación estructural.

Columna 6

Muestra: Fracción 4.2.2 de la columna 3 de este Protocolo, 868mg

Dimensiones de la columna: $\varnothing=3.56\text{cm}$ y $h=60\text{cm}$

Soporte: Silicagel 60 [230-400 mesh, 40-63 μ] (MERCK), 60g

Fase móvil: Tolueno/Acetona (99:1) 700mL, Metanol 150mL.

Condiciones: Se realizó esta purificación mediante Cromatografía Flash. La fase estacionaria llega a ocupar 13.5cm de altura en la columna. De las 5 fracciones reunidas y concentradas, la 2a (4.2.2.2) es sometida a nueva purificación, por presentar una gran pureza.

Columna 7

Muestra: Fracción 4.2.2.2, de la columna inmediatamente anterior, 345mg

Dimensiones de la columna: $\varnothing=3.56\text{cm}$ y $h=50\text{cm}$

Soporte: Silicagel 60 [230-400 mesh, 40-63 μ] (MERCK), 65g

Fase móvil: 2750mL del PRISMA formado por Tolueno/Acetona/Metanol, utilizando Hexano como solvente inerte, fuerza de solvencia 0.5, punto 811; finalmente, se empleó Metanol, 250mL.

Condiciones: Cromatografía Flash. Aunque se intentó reciclar la columna anterior, hubo que utilizar adsorbente nuevo y repetir el ensayo, porque no se obtuvo buena resolución. La fase móvil fue elegida mediante el sistema de optimización PRISMA [221]. La fracción segunda, que recibe el nombre de Fracción II.a -por ser, probablemente, idéntica a la Fracción I.a del Protocolo I-, de aspecto oleoso y color anaranjado claro, presenta en TLC una sola mancha bien definida, por lo que se somete a técnicas de elucidación estructural. Así mismo, se ensaya su actividad frente al edema

por carragenina, con el fin de comprobar si podría ser, al menos en parte, responsable de la actividad de la especie objeto de estudio de esta Memoria. El ensayo farmacológico se realiza también con una fracción obtenida de las columnas 8 y 9, que son comentadas a continuación.

Columna 8

Muestra: Fracción 4.3.2 de la columna 4 de este Protocolo II, 1g

Dimensiones de la columna: $\phi=3.7\text{cm}$, capacidad=615mL

Soporte: Silicagel 60 A CC [< 325 mesh, 20-45 μ] (SDS), 300g

Fase móvil: PRISMA, de fuerza de solvencia 0.7, formado por el punto 333 de éter Etílico/Diclorometano/Acetato de Etilo, con Hexano como solvente inerte. El consumo de fase móvil fue de 5.3L.

Condiciones: Técnica MPLC. Se optimizó el eluyente mediante el diseño PRISMA [221]. En la cuarta fracción obtenida, 4.3.2.4 aparecen unos cristales arborescentes muy finos, en las paredes de los tubos. En TLC se observan dos manchas, una de ellas sólo se revela al UV en la λ de 366nm, con fluorescencia azul - ciano. Se somete a nueva purificación, así como a ensayos farmacológicos.

Columna 9

Muestra: Fracción 4.3.2.4 de la columna inmediatamente anterior, 120mg

Dimensiones de la columna: $\phi=1.3\text{cm}$, capacidad=76.9mL

Soporte: Silicagel 60 A CC [< 325 mesh, 20-45 μ] (SDS), 40.3g

Fase móvil: Diclorometano 600mL

Condiciones: Equipo Labomatic de MPLC. Flujo 2.5mL/min, presión de 10-16mb. Ocasionalmente, la diferencia de temperatura, entre el interior de la columna y el medio ambiente, provocó la congelación del eluyente a la salida de la columna. La fracción segunda que se obtiene presenta una sola mancha altamente pura, de la que se procede a elucidar su estructura. Esta fracción

al secarse presenta un aspecto blanquecino y cristaliza espontáneamente en recipientes de elevada superficie de evaporación, en forma de arborescencias. Recibe el nombre de Fracción II.c.

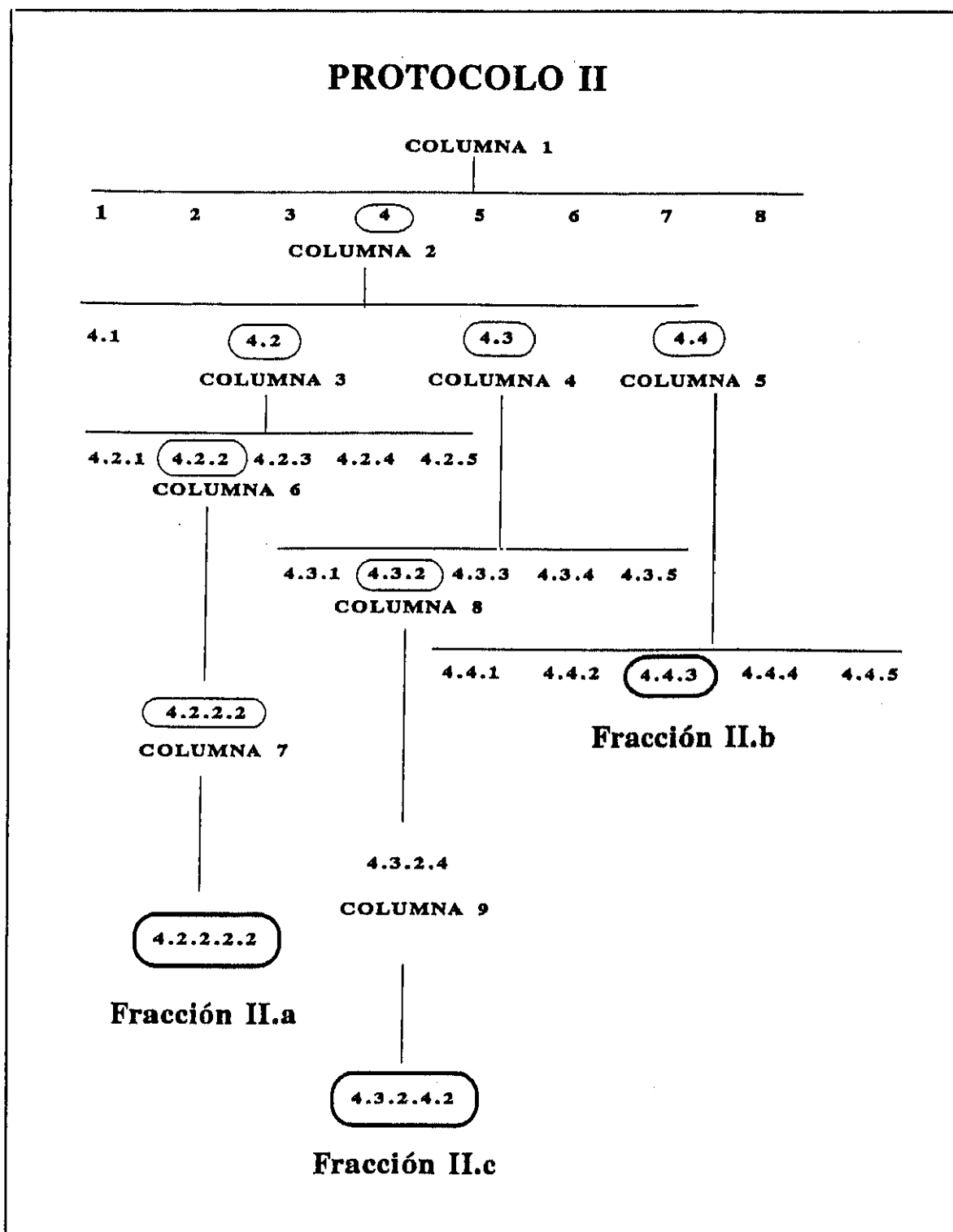
Seguimiento de la actividad antiinflamatoria

Se ensayó la actividad inhibitoria del edema plantar por carragenina, de las fracciones 4.2.2.2.2 o II.a (columna 7 de este Protocolo II) y 4.3.2.4.2 o II.c (columna 9, Protocolo II). En la Tabla XVII pueden apreciarse los incrementos de volumen plantar \pm error standard y los porcentajes de actividad antiinflamatoria. Mediante la 't de Student' se establece el grado de significación estadística.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE AL EDEMA PLANTAR AGUDO			
$\Delta V \pm ES$ / Inhibición del edema plantar			
Lote	3 h	5 h	7 h
Control	0.18 ± 0.012 ---	0.21 ± 0.016 ---	0.17 ± 0.010 ---
Fenilbutazona	0.09 ± 0.007 50.00 %	0.07 ± 0.007 66.67 %	0.06 ± 0.008 64.71 %
Fracción 4.2.2.2.2 columna 7	0.09 ± 0.008 50.00 %	0.07 ± 0.010 66.67 %	0.09 ± 0.010 47.06 %
Fracción 4.3.2.4.2 columna 9	0.08 ± 0.006 55.56 %	0.08 ± 0.012 61.90 %	0.07 ± 0.013 58.82 %

Tabla XVII. Actividad antiinflamatoria de dos fracciones de las columnas 7 y 9, respectivamente, frente al edema plantar por carragenina. $p < 0.01$ vs. control.

La actividad de estas dos fracciones es muy similar a la presentada por la fenilbutazona, sobre todo a las 3 y 5 horas, hecho muy satisfactorio, dado el grado de purificación alcanzado, por lo que es posible que los principios que estas fracciones contienen, sean responsables, al menos en parte de la actividad de la especie *Teucrium buxifolium*, de la que proceden.

Figura 48. Fraccionamiento del Extracto Hexánico de *Teucrium buxifolium*

Esquema del Protocolo II

ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL FRACCIONAMIENTO CROMATOGRAFICO

Una vez optimizado el proceso de fraccionamiento del extracto hexánico, es posible extraer del mismo una serie de conclusiones, de carácter especialmente útil en posteriores purificaciones.

En primer lugar, es obvio que el uso del Sephadex como fase estacionaria, en los primeros pasos de la purificación del extracto hexánico, no proporciona resultados adecuados. Además, la fase móvil empleada con dicho soporte, el Metanol, no disuelve totalmente la muestra. Sin embargo, en las fases finales de la purificación, el lecho de Sephadex resultó algo más ventajoso, aunque el problema de solubilidad en Metanol permanece. La fase estacionaria que mejores resultados ha proporcionado ha sido el Silicagel. Por otro lado, los solventes más apropiados para comenzar el proceso de fraccionamiento fueron Hexano y Benceno, aumentando la polaridad con Acetona o Acetato de Etilo; mientras que, en los pasos finales de la purificación, los solventes empleados han sido de mayor polaridad, como el Diclorometano.

El uso de técnicas de MPLC ha resuelto el grave problema de la precipitación del extracto hexánico de *Teucrium buxifolium*, al permitir una carga de muestra de mayor volumen, ya que dicha precipitación parece debida probablemente a sobresaturación; por lo que, la combinación de técnicas de MPLC y Cromatografía Flash ha resultado obviamente ventajosa, en el proceso de fraccionamiento de dicho extracto, tal y como ya apuntaba la bibliografía [141].

Mediante el proceso de fraccionamiento, llevado a cabo con el extracto hexánico de *Teucrium buxifolium*, se ha llegado a la obtención de 2 fracciones de alta pureza en el Protocolo I y 3 en el Protocolo II. De estas tres últimas fracciones, dos de ellas coinciden con las obtenidas mediante el primer Protocolo. Puede afirmarse la presencia de principios químicos responsables de la actividad del extracto hexánico en dichas fracciones, ya que al tiempo que se realizó el fraccionamiento cromatográfico se llevó a cabo el seguimiento de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas. Estas fracciones seleccionadas por su pureza y actividad antiinflamatoria han sido sometidas a elucidación estructural.

TÉCNICAS DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

CONSIDERACIONES GENERALES

Como ya se ha indicado, los procesos de fraccionamiento cromatográfico a que ha sido sometido el extracto hexánico de la especie *Teucrium buxifolium*, han rendido varias fracciones de gran pureza, según indica su comportamiento cromatográfico en TLC:

I.a y I.b, obtenidas por el protocolo de fraccionamiento I

II.a, II.b y II.c, obtenidas por el protocolo de fraccionamiento II

Con el fin de identificar los componentes de estas fracciones, se procede al estudio de las mismas mediante las técnicas analíticas precisas para la determinación de su estructura.

La Fracción I.a presenta el mismo aspecto cromatográfico que II.a, y dado que no se dispone de suficiente cantidad de dicha Fracción I.a se asumirá que es idéntica a II.a, realizando el estudio estructural de ésta última.

Así mismo, la fracción I.b ofrece el mismo desarrollo cromatográfico que la II.b, y al disponer de mayor cantidad de ésta última, se completará el análisis estructural con la misma.

Con el fin de identificar los componentes de estas fracciones, se someten a las técnicas analíticas precisas para la determinación de su estructura.

La elucidación estructural de compuestos orgánicos se lleva a cabo, fundamentalmente mediante técnicas espectroscópicas [241,314], utilizando en este caso la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear y Espectroscopía de Masas, combinada con técnicas de Cromatografía de Gases.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Consiste en una técnica espectroscópica de absorción, en la cual se requiere que la muestra sea sometida a un campo magnético intenso, antes de que la radiación sea absorbida por los núcleos.

En ausencia de campo magnético, los estados de espín de los núcleos son degenerados, es decir poseen igual energía, y por lo tanto no son posibles transiciones entre niveles energéticos.

Al someter a las moléculas al campo magnético, ciertos núcleos de número cuántico de espín (I) semientero, como el ^1H o el ^{13}C , se comportan como imanes pudiendo orientarse en dos posibles direcciones, que corresponden a los valores de ($I = +1/2$) e ($I = -1/2$), alineándose en favor o en contra, respectivamente, del campo magnético exterior aplicado, siendo más estable aquella en la que el momento magnético nuclear está orientado en la misma dirección que el campo magnético.

La RMN cuantifica la energía electromagnética necesaria para la transición de uno a otro estado, es decir para orientar los núcleos en contra del campo, en forma de desplazamientos químicos (δ , en ppm).

Además, las técnicas de RMN proporcionan información acerca del entorno, número y clase, de núcleos vecinos, que surge del acoplamiento espín-espín (constante de acoplamiento, J , en Hz).

Espectrometría de Masas (EM)

Las técnicas de espectrometría de masas por impacto electrónico, es el método de análisis molecular más sensible, ya que registra una distribución de masas de iones positivos que constituyen la huella dactilar de un compuesto.

El bombardeo con electrones sobre una molécula ocasiona una pérdida de un electrón, con formación de un catión radical, inestable por su exceso de energía, por lo que se fragmentará. Debido a que los diferentes enlaces

necesitan diferentes cantidades de energía para romperse, cada molécula tendrá un patrón de fragmentación único.

Entre los fragmentos que se originan están los iones positivos, que se separan y registran en función de su relación masa/carga (m/z) y como la carga es generalmente la unidad, entonces $m/z = m$. Esto permitirá conocer el peso molecular de la sustancia analizada por espectrometría de masas.

En estas técnicas, son fácilmente detectables las impurezas, ya que se descubren por la aparición de picos adicionales y la racionalización de los patrones de fragmentación constituye una herramienta de indudable valor en la elucidación estructural.

Por otro lado, en el análisis de mezclas, hecho frecuente en el caso de productos de origen natural, es comúnmente empleada la combinación de técnicas de Cromatografía de Gases y Cromatografía Líquida de Alta Resolución, con la Espectrometría de Masas (CG/EM, HPLC/EM).

MATERIAL Y MÉTODOS

ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE FRACCIONES DE *Teucrium buxifolium*

EQUIPO INSTRUMENTAL

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) se realizaron en espectrómetro Varian XL 400 y Bruker AC 250, mientras que la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C -RMN) se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker AM 200, empleando como disolvente el cloroformo deuterado (CDCl_3) y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. La espectrometría de masas se ha realizado en un espectrómetro VG 12-250, realizando los espectros a una potencia de 70 eV. El cromatógrafo de gases empleado fue un HP 5890, acoplado a un espectrómetro de masas HP 5971A; la columna capilar utilizada posee una longitud de 12m, recubierta de FE/30, en el intervalo de temperaturas de 180°C - 250°C, a 4°C/min.

FRACCIONES I.a y II.a

Al no disponer de suficiente cantidad de la Fracción I.a no fue posible realizar el estudio espectroscópico necesario para la determinación de su estructura. Debido a que su comportamiento cromatográfico es idéntico al presentado por la Fracción II.a, se asume que probablemente se trate del mismo compuesto o al menos de isómeros.

El análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de masas de la Fracción II.a (Figuras 49 y 50) indica que se trata de una mezcla de tres sustancias estructuralmente relacionadas entre sí, en la proporción {1:6:1} (Figura 51). El componente principal, analizado en espectrometría de masas, indica la presencia de un ión molecular a $m/z = 222$ (Figura 52), que podría corresponder a $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$. Se trataría, por tanto, de un sesquiterpeno.

Se ha realizado el espectro de ^1H -RMN (Figura 53), ^{13}C -RMN (Figura 54), DEPT (Figura 55) y COSY (Figuras 56 y 57) de la muestra problema.

El espectro de protón muestra señales a δ 4.85ppm (1H) (d, $J = 0.8$ Hz) y δ 4.96ppm (1H) (d, $J = 1.2$ Hz) (Figura 53). Dichas señales pueden corresponder a dos protones de doble enlace exocíclico.

El cuartete a δ 2.85ppm (1H) (q, $J_1 = 3$ Hz; $J_2 = 8$ Hz), debe corresponder al protón geminal de un grupo hidroxilo.

Por último, una señal de doble doblete hacia δ 2.60ppm puede corresponder a un protón alílico.

Este protón alílico, posiblemente H-5, daría una señal de doblete si hubiese un sustituyente sobre C-6, como ocurre con el eudesmeno utilizado como modelo. Sin embargo, si no hay sustituyente sobre C-6, cabe esperar una señal de cuartete o doble doblete para H-5.

El espectro COSY (Figura 57) confirma que no existe acoplamiento alguno entre las señales asignadas al protón geminal de hidroxilo y el protón alílico.

Del espectro COSY se deduce también que los dos protones de C-9 aparecen a δ 2.2ppm y 1.4ppm, respectivamente. A su vez, los protones acoplados a H-5, esto es los dos protones del metileno C-6, se encuentran a δ 1.6ppm y 1.75ppm, respectivamente.

Y por último de los espectros de protón señalar que los tres grupos metilo aparecen a δ 0.865ppm, 0.880ppm y 0.906ppm.

Con respecto al espectro de ^{13}C (Figura 54) se puede indicar que muestra las siguientes señales (δ , ppm): 151.8 (s), 112.72 (t), 63.7 (d), 59.8 (d), 50.86 (d), 48.73 (d), 39.8 (t), 39.18 (t), 34.0 (s), 30.17 (t), 29.69 (t), 29.86 (q), 29.88 (t), 27.23 (t), 22.97 (t), 21.62 (q), 16.98 (q).

El recuento total es de dieciséis señales, aparte de otras menos intensas, como la de 22.97 (t), en vez de las quince esperadas para un sesquiterpeno. Ello se debe a la presencia de dos pequeñas impurezas, probablemente relacionadas con el componente principal, que pueden dar lugar a esas señales.

Comparación de estos datos de ^{13}C -RMN con espectros publicados para sesquiterpenos [138], lleva a proponer un esqueleto de tipo eudesmano para esta sustancia (Figura 58), correspondiendo el componente principal al 8-hidroxi-4(15)-eudesmeno. Esta estructura puede explicar el espectro observado.

Los valores asignados a C-9 (δ 39.8) y C-5 (δ 50.86) de este compuesto hacen pensar que la unión de anillos debe ser *trans*, comparando los valores de los desplazamientos químicos de estos dos carbonos para el *cis* y para el *trans* eudesmano, ambos con grupo hidroxilo sobre C-6.

	Isómero <i>cis</i> [138]	Isómero <i>trans</i> [121]	Fracción II.a
C-5	60.30	55.95	50.86
C-9	39.80	36.33	39.80

Al trasladar un -OH de C-6 a C-8, el desplazamiento químico de C-5 debe trasladarse a campo más alto y el de C-9 a campo más bajo. Esto es precisamente lo que ocurre si se compara con los datos del isómero *trans*.

Por el contrario, si esta sustancia con esqueleto de 4(15)-eudesmeno y un grupo de OH sobre C-8, tuviese una unión *cis* de los dos anillos, cabría esperar señales para el C-9 en el entorno de δ = 46-47ppm, y para C-5, en el entorno de δ = 53-54ppm, con multiplicidades de triplete y doblete, respectivamente. Ninguna de estas dos señales se aprecia en el espectro, por lo que se consideró que la unión de anillos debía ser *trans*.

De acuerdo con los espectros de CG/EM, además del pico 2 (Figura 59), correspondiente al componente principal, las dos pequeñas impurezas deben corresponder con un eudesmano diinsaturado (PM 220, pico 1) (Figura 60) y un eudesmano dihidroxilado (PM 238, pico 3) (Figura 61).

Solida 70 eV

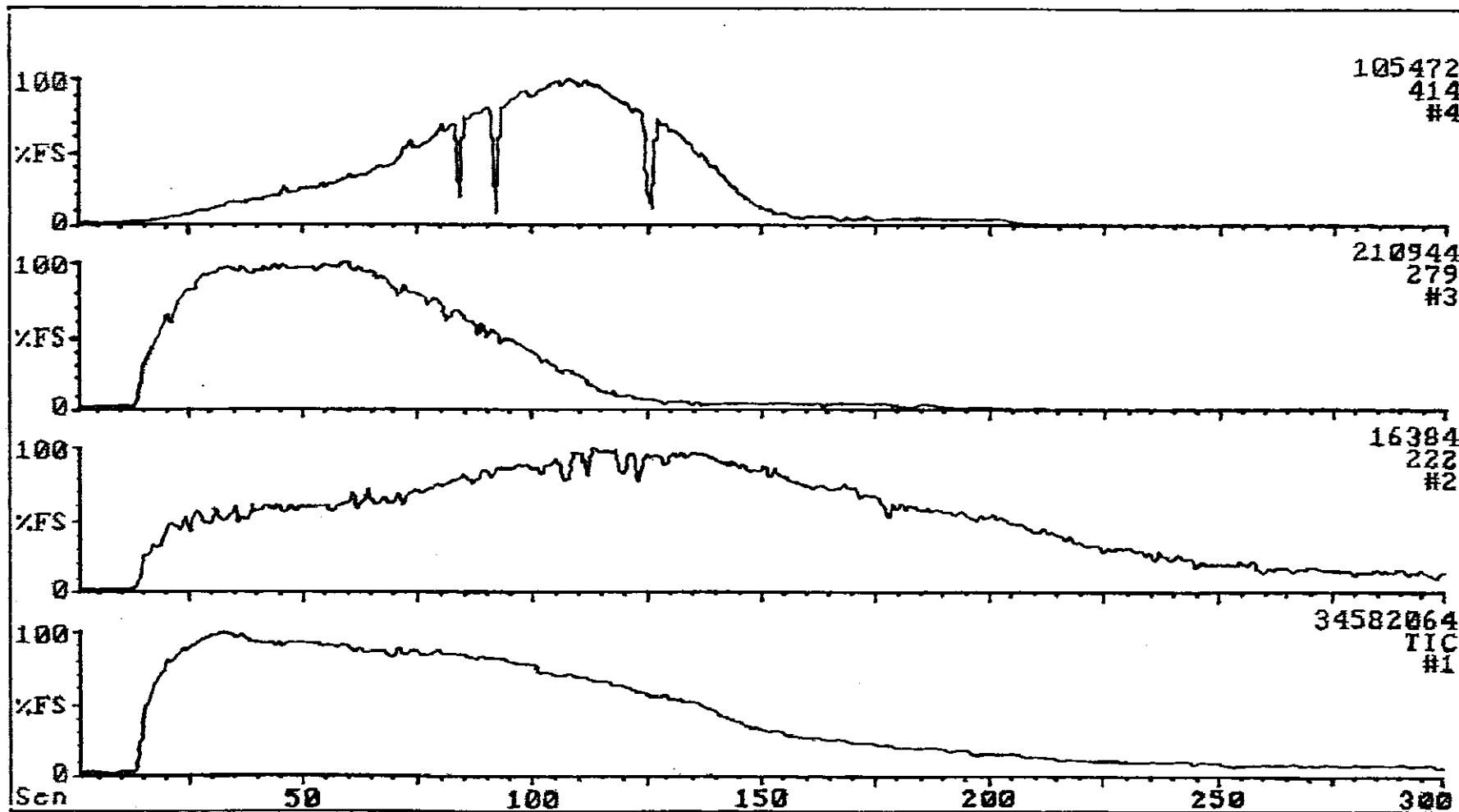


Figura 49. CG/EM de la Fracción II.a

Solida 70 eV

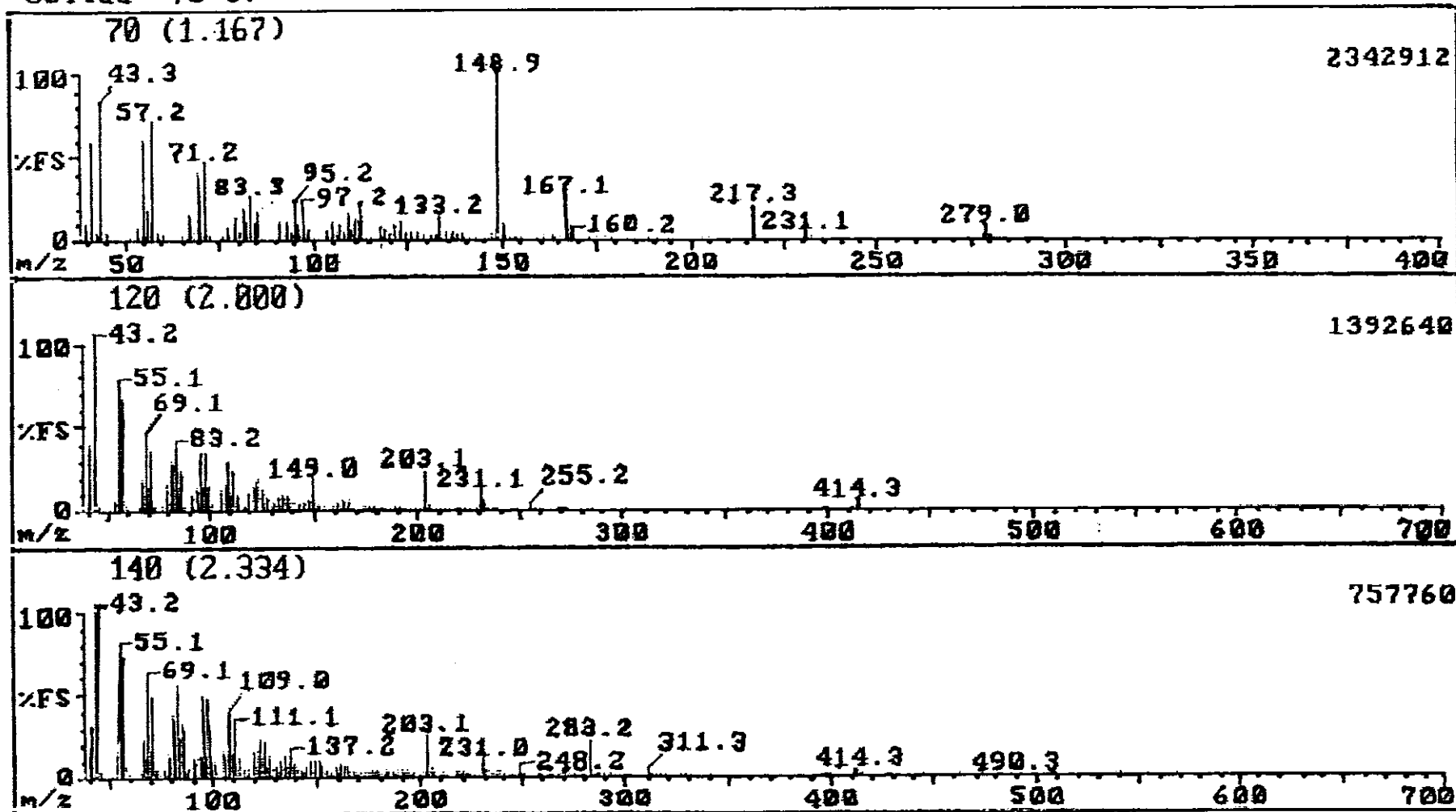


Figura 50. CG/EM de la Fracción II.a

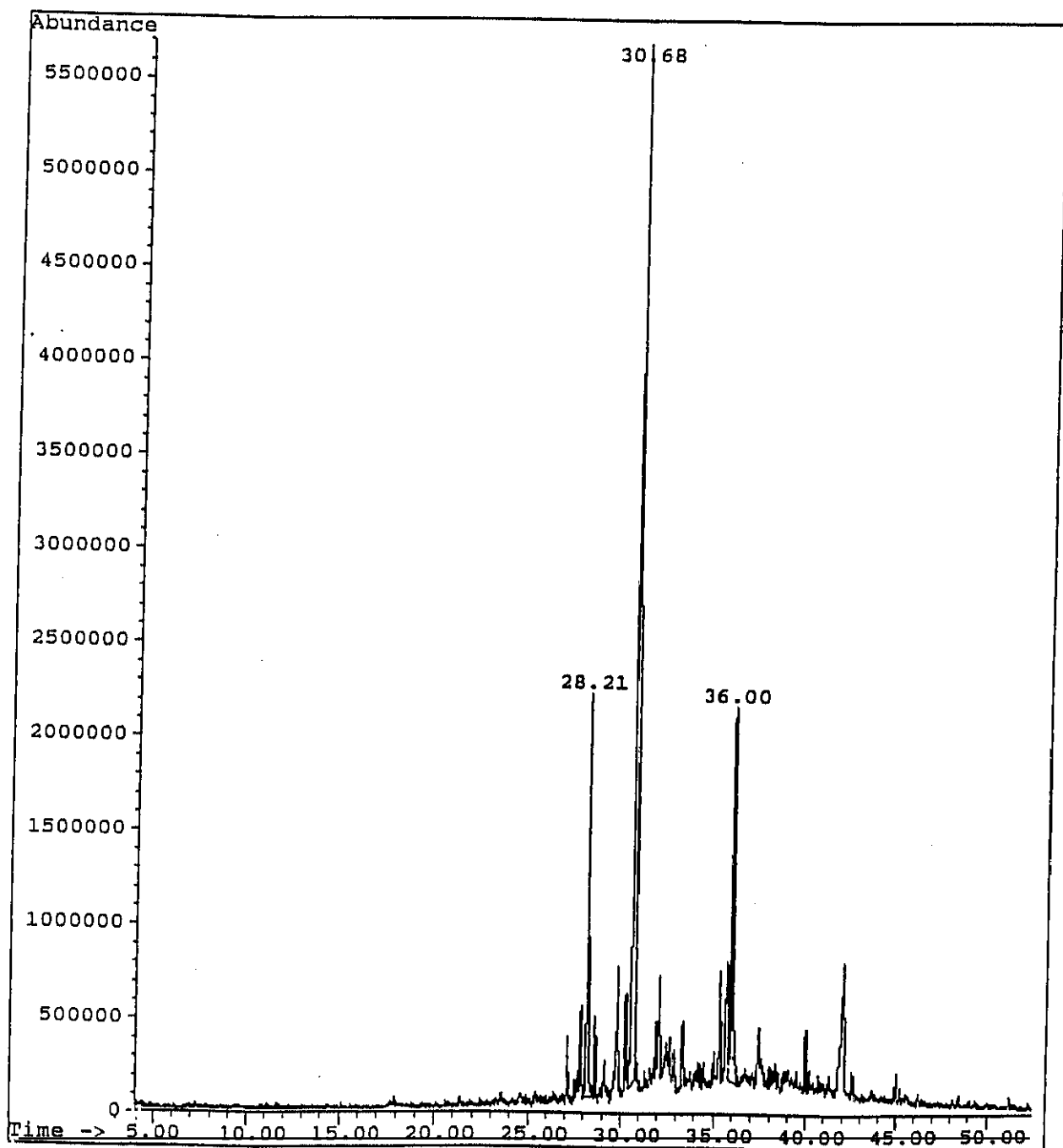


Figura 51. Espectro de masas de la Fracción II.a, aparecen tres componentes en la proporción {1:6:1}

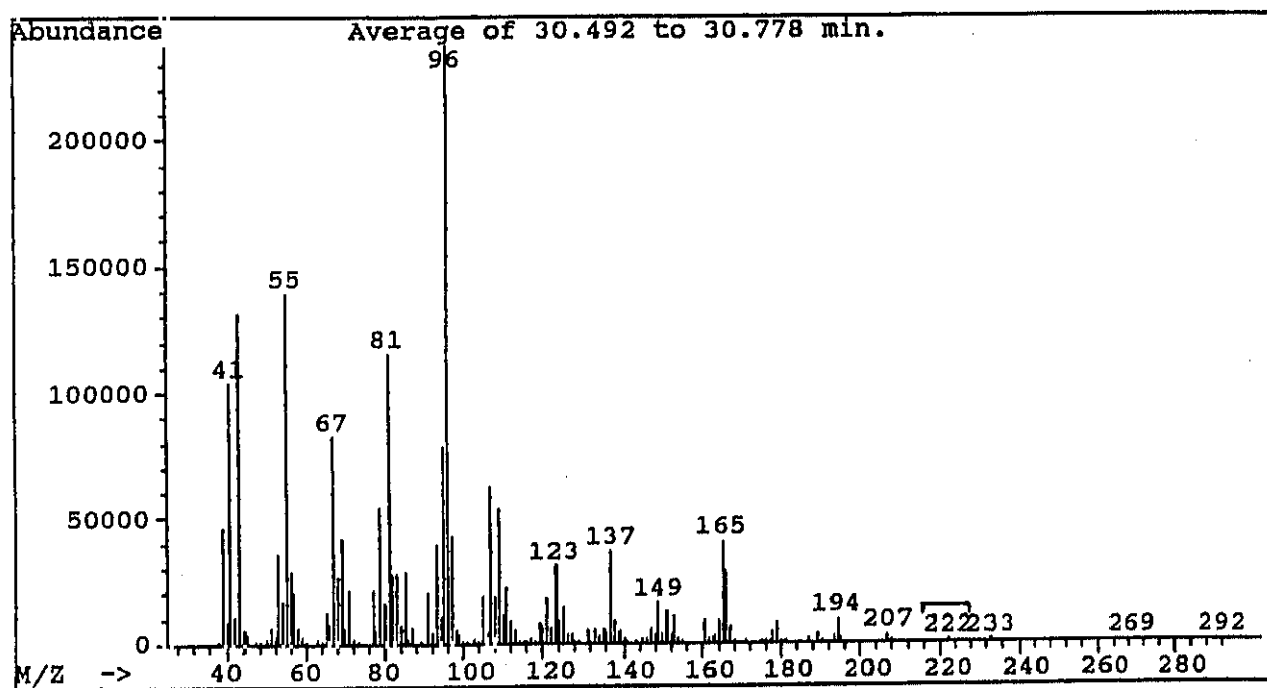
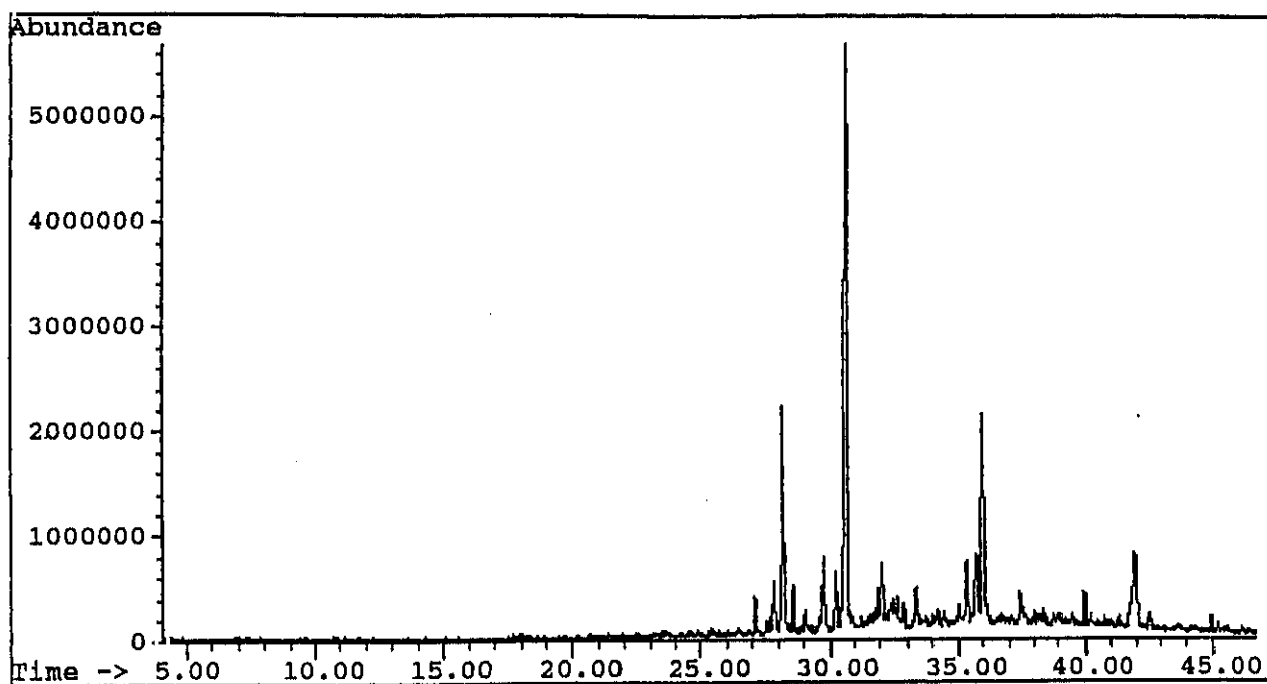


Figura 52. CG/EM de la Fracción II.a,
presencia de un ión molecular a $m/z=222$.

INDEX	FREQ	PPM	INTENSITY
01	2173.43	7.246	53.802
02	1488.74	4.963	27.518
03	1487.52	4.959	28.188
04	1454.15	4.848	34.317
05	1453.36	4.845	27.692
06	1452.49	4.843	29.702
07	861.20	2.871	14.466
08	850.68	2.836	15.034
09	628.52	2.093	21.157
10	616.10	2.054	16.700
11	524.81	1.750	15.239
12	502.24	1.674	24.336
13	493.75	1.646	23.873
14	491.55	1.639	21.282
15	480.81	1.603	29.975
16	400.13	1.334	17.153
17	398.53	1.329	19.487
18	395.95	1.320	17.016
19	393.94	1.313	17.902
20	392.13	1.307	20.592
21	391.10	1.304	18.786
22	387.89	1.293	29.269
23	386.27	1.288	24.852
24	383.39	1.278	19.013
25	380.03	1.267	23.643
26	372.16	1.241	105.013
27	356.75	1.189	136.073
28	297.64	0.992	149.629
29	291.10	0.971	188.810
30	288.60	0.962	15.630
31	281.28	0.938	14.469
32	275.18	0.917	16.607
33	271.62	0.906	20.002
34	264.00	0.880	18.279
35	259.31	0.865	17.559

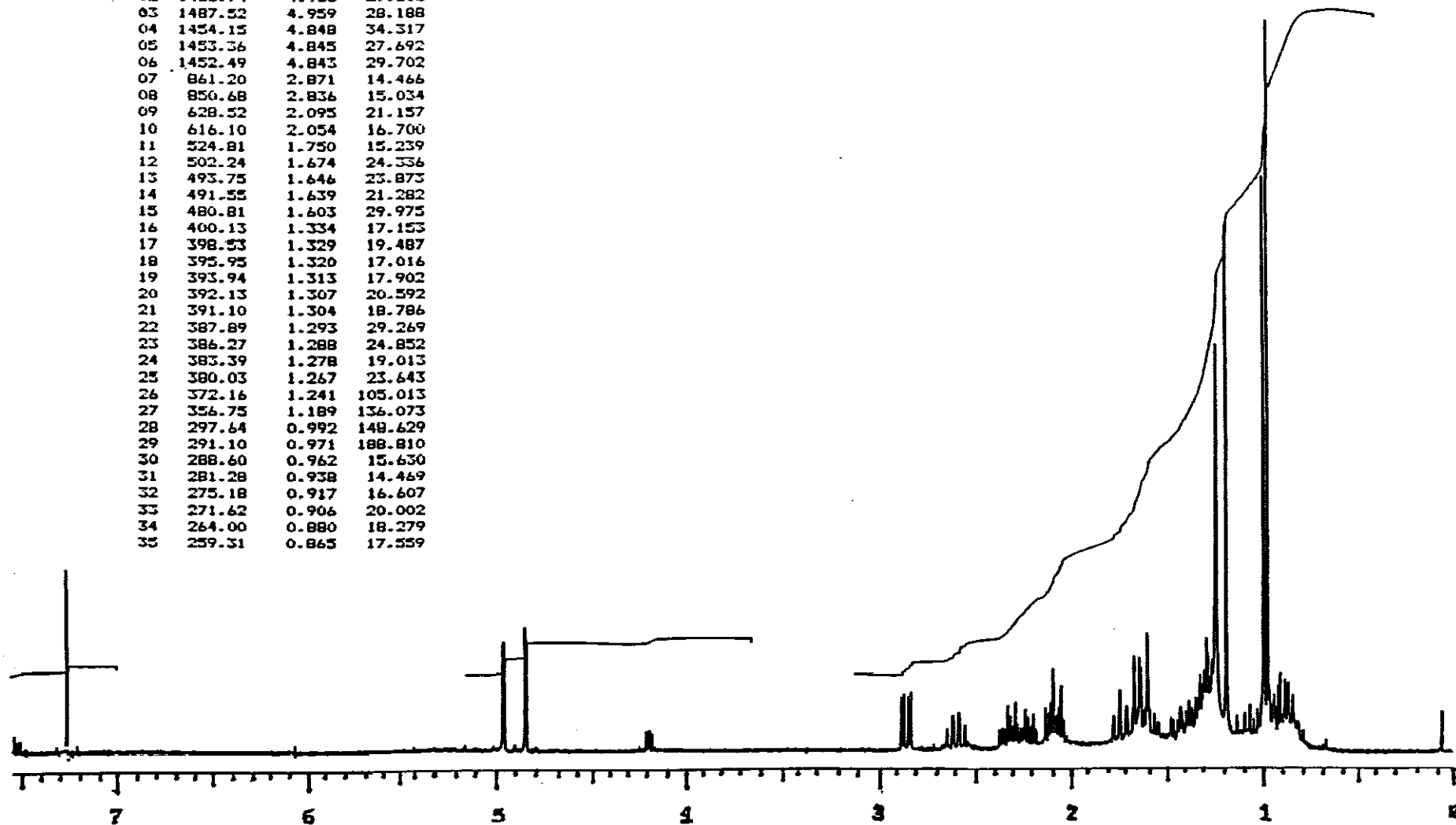


Figura 53. Espectro de ¹H-RMN de la Fracción II.a

SPECTRAL LINES FOR TH= 4.7
 rfi= 10264.1, rfp= 9678.7

INDEX	FREQ. (Hz)	PPM	HEIGHT
1	21081.1	167.71	5.7
2	19885.8	151.85	30.0
3	17039.0	135.56	4.9
4	16654.4	132.50	6.2
5	16446.1	130.84	15.3
6	16189.8	128.80	12.6
7	14168.7	112.72	104.4
8	9710.7	77.25	199.0
9	9678.7	77.00	200.8
10	9647.4	76.75	197.9
11	8567.8	68.16	15.7
12	8010.1	63.73	95.4
13	7516.4	59.80	32.0
14	6393.4	50.86	75.0
15	6124.8	48.73	94.3
16	5902.5	39.88	102.2
17	4925.4	39.18	87.9
18	4873.5	38.77	14.9
19	4685.7	36.64	5.1
20	4273.1	34.00	39.8
21	4011.4	31.91	13.4
22	3819.9	30.39	16.4
23	3792.4	30.17	103.2
24	3755.8	29.88	113.6
25	3753.5	29.86	97.6
26	3731.4	29.69	63.7
27	3726.0	29.64	17.6
28	3694.0	29.39	7.7
29	3687.9	29.34	12.9
30	3636.8	28.93	17.8
31	3422.4	27.23	87.1
32	2988.2	23.77	13.7
33	2886.8	22.97	17.8
34	2849.4	22.67	12.7
35	2718.2	21.62	92.5
36	2133.7	16.98	90.5
37	1769.8	14.08	13.3

INDEX	FREQ. (Hz)	PPM	HEIGHT
38	1761.4	14.81	11.5
39	1376.1	10.95	15.4

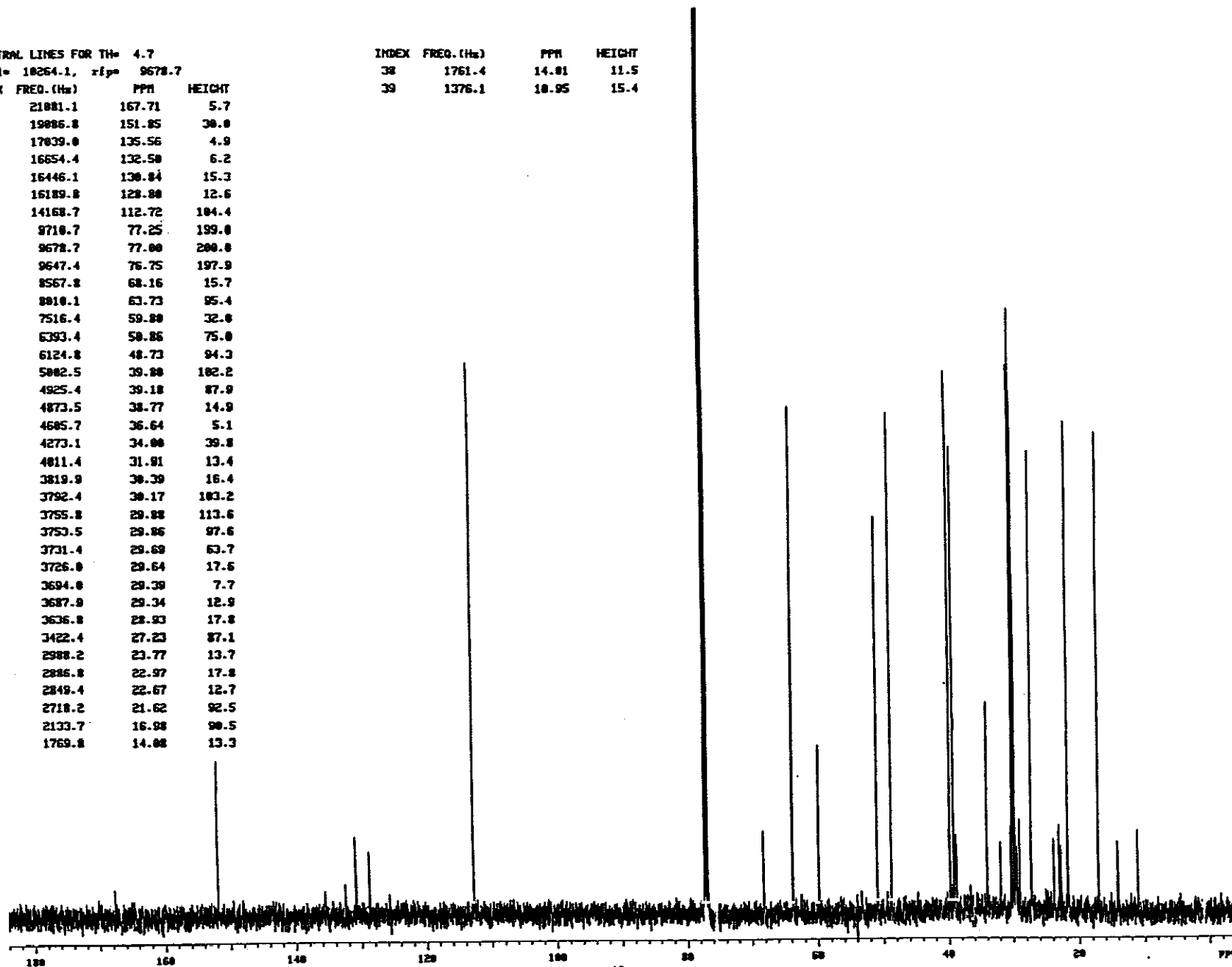


Figura 54. Espectro de ¹³C-RMN de la Fracción II.a

#	CURSOR	FREQUENCY	PPM	INTENSITY
1	6264	6574.763	100.6504	3.113
2	6406	6471.741	108.6072	2.706
3	7319	5662.982	112.5320	-18.324
4	10608	3420.483	67.9693	-2.758
5	10913	3197.214	63.5334	13.778
6	11204	2549.204	50.6565	15.056
7	11952	2442.121	48.5386	12.872
8	12571	1992.336	39.5947	-18.259
9	12613	1961.806	38.9840	-16.323
10	12642	1940.859	38.5672	3.173
11	13222	1519.191	30.1886	-2.113
12	13237	1508.321	29.9726	-17.346
13	13257	1494.088	29.6898	8.103
14	13259	1492.229	29.6528	-14.301
15	13271	1483.773	29.4848	-13.250
16	13441	1359.994	27.0231	-16.585
17	13680	1186.452	22.5766	-2.973
18	13726	1145.742	22.7676	-2.571
19	13829	1078.212	21.4257	12.274
20	14151	844.288	16.7773	14.816
21	14731	698.973	13.8888	2.193
22	14568	541.127	10.7550	2.976

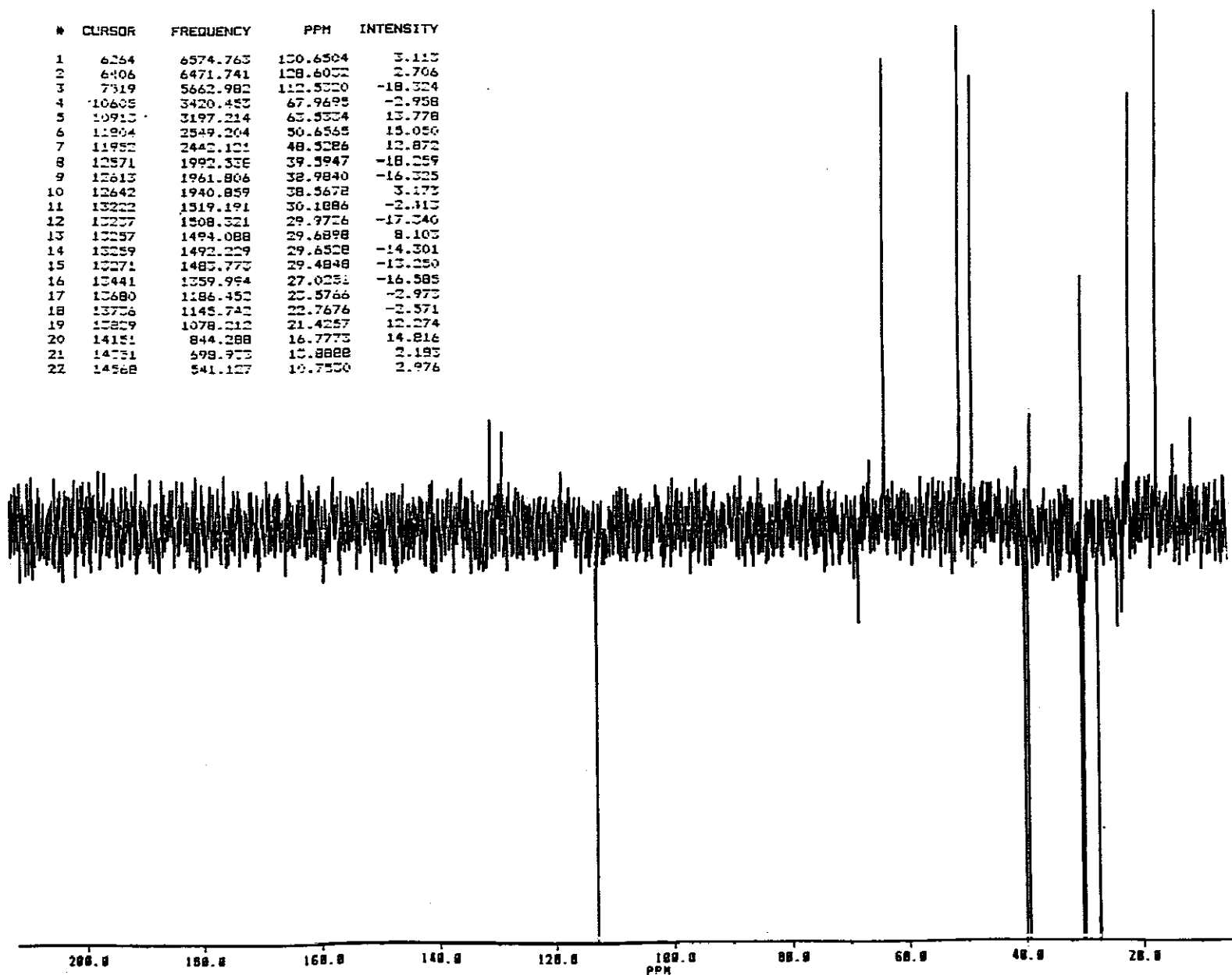


Figura 55. DEPT de la Fracción II.a

VARIAN XL-400
STANDARD 1H OBSERVE
EXP5 PULSE SEQUENCE: COSY
DATE 17-04-93
SOLVENT CDCL3
FILE COSY

COSY PULSE SEQUENCE
OBSERVE PROTON
FREQUENCY 299.943 MHZ
1D SPECTRAL WIDTH (F2) 1600.0 HZ
2D SPECTRAL WIDTH (F1) 1600.0 HZ
ACQ. TIME 0.16 SEC
RELAXATION DELAY 2.0 SEC
PULSE WIDTH 57 DEGREES
FIRST PULSE 57 DEGREES
TEMPERATURE 30.0 C /
303.1 K
NO. REPETITIONS 16
NO. INCREMENTS 128
DATA PROCESSING
PSEUDO-ECHO SHAPED
FT SIZE 512 X 512
TOTAL TIME 1 HOUR
24.5 MINUTES

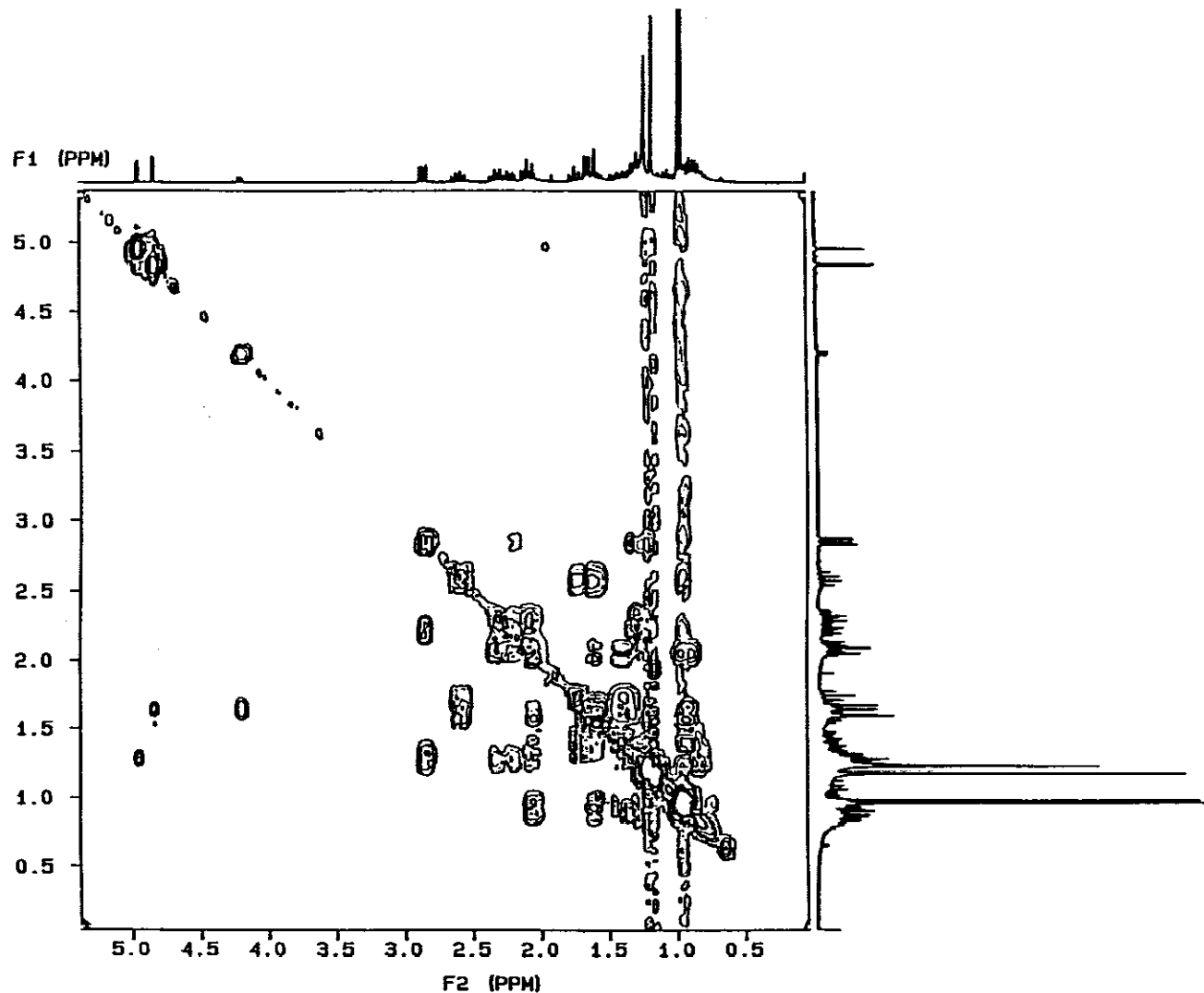


Figura 56. COSY de la Fracción II.a

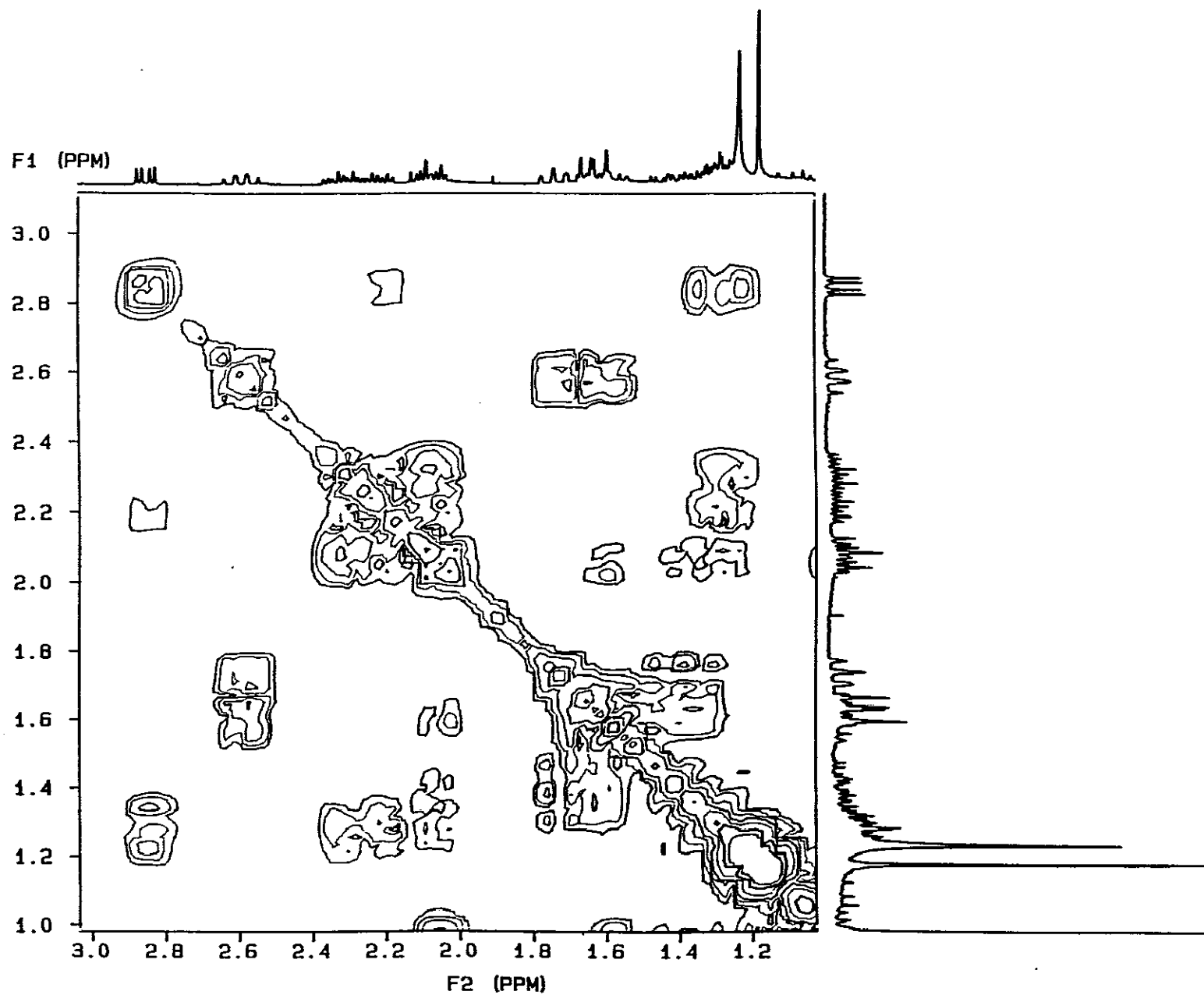
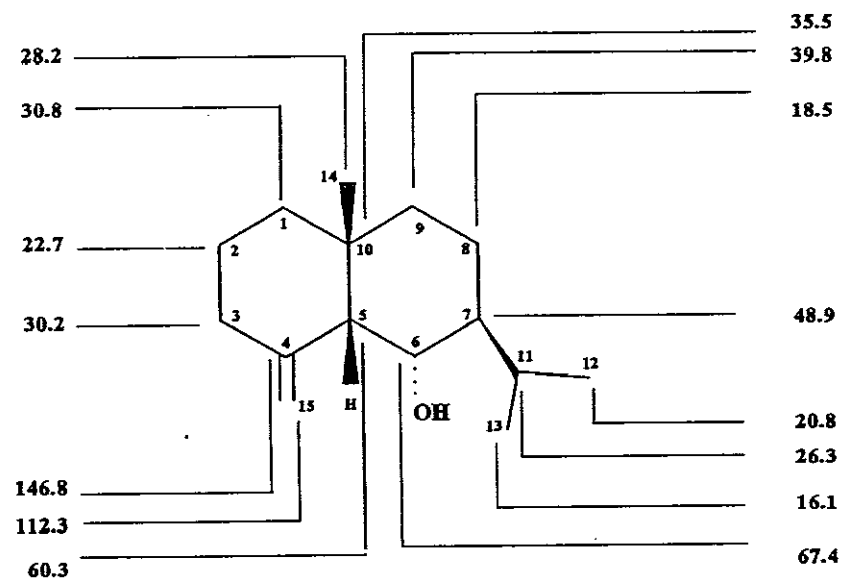
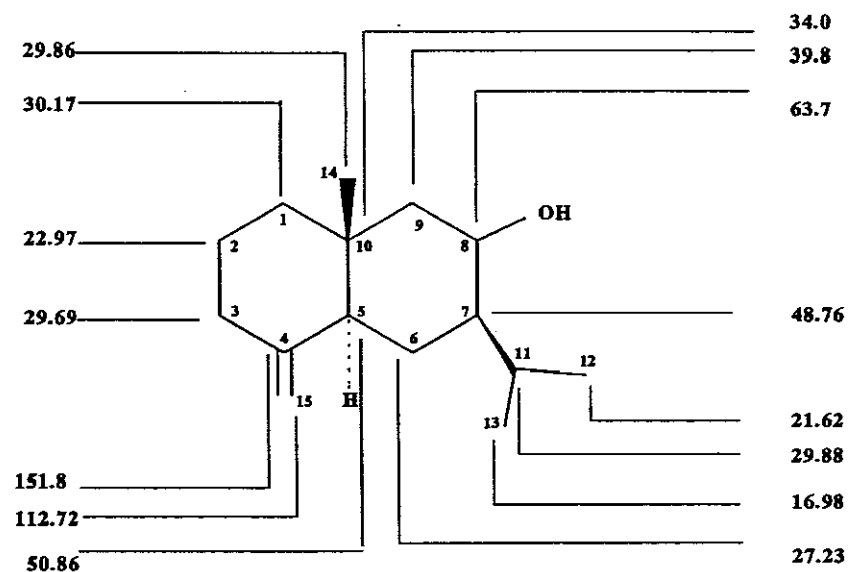


Figura 57. COSY (ampliado) de la Fracción II.a



**6 α hidroxi-4(15)-eudesmeno
(*cis*)**



**8-hidroxi-4(15)-*trans*-eudesmeno
Fracción II.a**

Figura 58. Esqueleto de un *cis* eudesmano [138] y propuesta de esqueleto *trans* eudesmano para la Fracción II.a

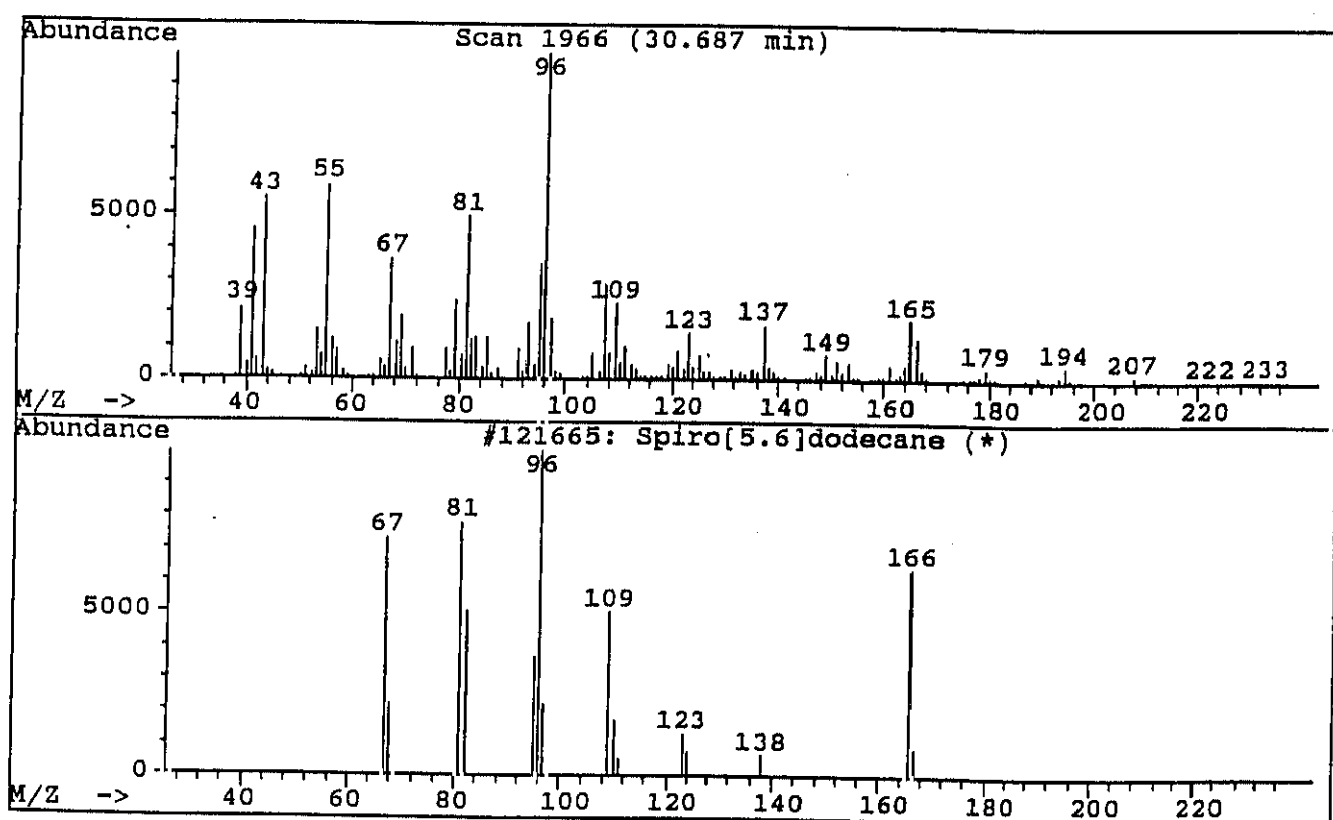


Figura 59. Espectro de Masas de II.a, pico 2, componente principal:

8-hidroxi-4(15)-eudesmeno

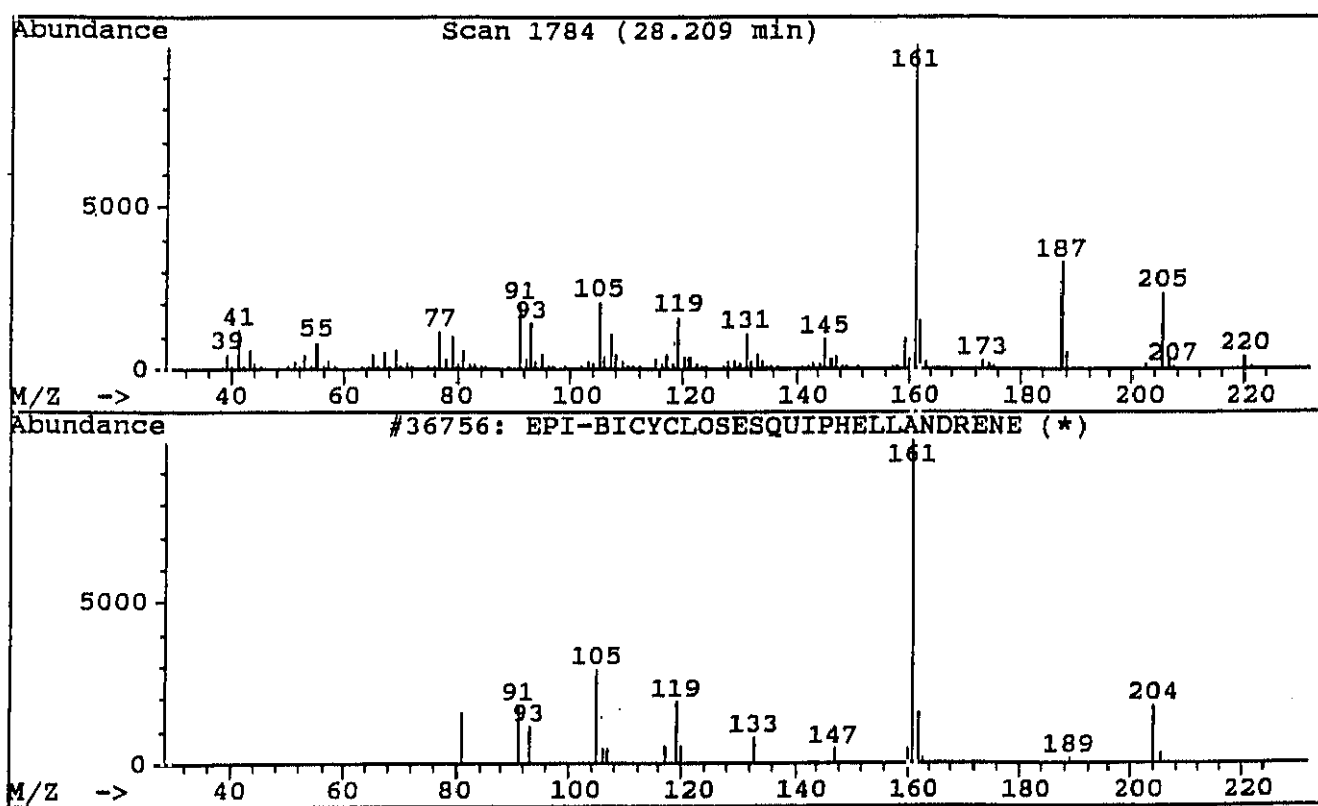


Figura 60. Espectro de Masas de II.a, pico 3,
propuesta de eudesmano diinsaturado

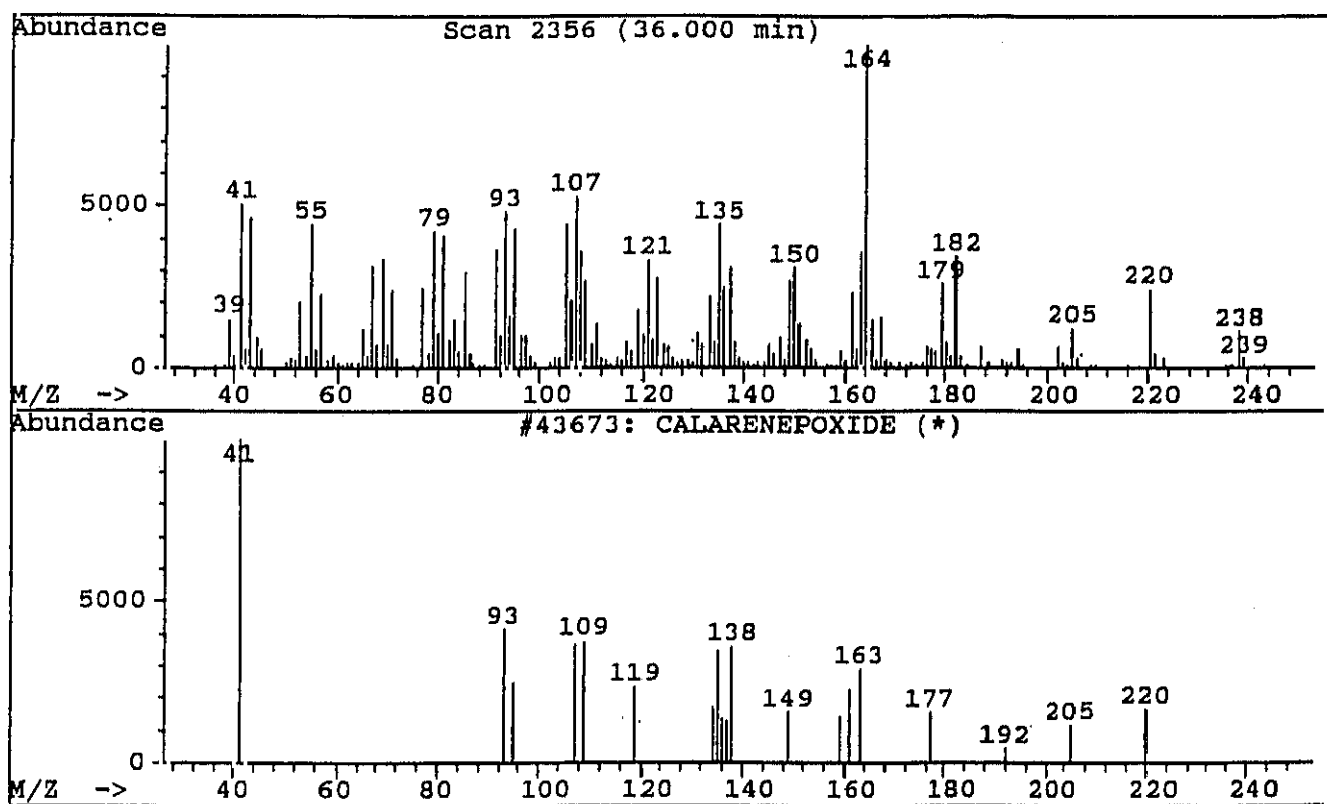


Figura 61. Espectro de Masas de II.a, pico 3,
propuesta de eudesmano dihidroxilado

FRACCIONES I.b Y II.b

Se realizó el espectro de RMN de ^1H y ^{13}C para la Fracción I.b, comprobando, con posterioridad, que coinciden sus señales con las presentadas por la Fracción II.b. Al disponer de mayor cantidad de muestra tras el protocolo II, se amplió el estudio espectroscópico, con el fin de completar su caracterización.

Con respecto a la espectroscopía de RMN, se realizaron los espectros de ^1H -RMN (Figura 62), ^{13}C -RMN (Figura 63) y DEPT (Figura 64).

El espectro de protón (Figura 62) muestra numerosas señales de metilo entre $\delta = 0.6-1.0\text{ppm}$, así como los siguientes valores de desplazamiento químico: δ 5.14 (d); δ 5.12 (m); δ 4.70 (m); δ 3.50 (m).

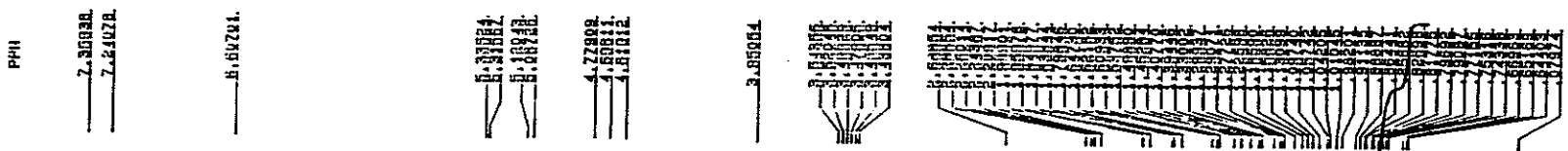
El espectro de C-13 (Figura 63) indica claramente que son varios los productos presentes en la muestra, no siendo posible su separación en columna, aunque quizá si se separe el producto acetilado. Por ello se procedió a realizar una acetilación con CH_2Cl_2 , Et_3N , Ac_2O , a tiempo corto (aproximadamente, 2 horas). En TLC, usando como eluyente Hexano:Acetona (9:1) se observa la formación de un derivado acetilado, quedando parte del producto inicial sin acetilar. Si la acetilación se efectúa durante 18h, se acetila prácticamente toda la muestra. El producto de la acetilación se separó en columna, empleando como fase móvil Hexano:Acetona (9:1). La fracción 3a (4mg) contiene el derivado acetilado. Las fracciones 7-10 constituyen el producto sin acetilar. Los espectros de RMN de ^1H indican que la muestra sigue siendo mezcla de varios compuestos (Figura 65), por lo que no han podido separarse tampoco preparando los derivados acetilados (Figura 66).

Por consiguiente, se les sometió a espectrometría de masas y a una separación mediante cromatografía de gases, utilizando los trimetilsililderivados.

La muestra contiene sustancias de peso molecular 412 y 414 (Figura 67), que deben corresponder a esteroides de fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ y $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$.

En la cromatografía de gases de los derivados sililados se detectaron sus componentes, siendo mayoritarios los compuestos 3, 4 y 5 de los tiempos de retención 19.0, 20.51 y 21.29, respectivamente y que, en conjunto, representan más del 90% de la muestra (Figura 68). Estos compuestos comparten una estructura de 3-hidroxi-5-estigmasteno (Figura 69).

El componente 3 ha sido identificado como 3 β -hidroxi-22E-5,22-estigmastadieno, más conocido como estigmasterol (Figura 70). El componente 4 corresponde a un 3 β -hidroxi-5-estigmastadieno (Figura 71), no siendo posible determinar la posición exacta del segundo doble enlace. El componente 5 se ha identificado como el 3 β -hidroxi-5-estigmasteno, también llamado β -sitosterol (Figura 72).



HZTBE.101
 DATE 10-5-93
 SF 250.133
 SY 250.0
 O1 4311.814
 SI 32768
 TD 32768
 SN 5000.000
 HZ/PT .305
 PW 7.0
 RD 0.0
 AB 3.277
 RB 2
 NS 16
 TE 287
 FW 6300
 O2 2714.489
 DP 63L P0
 LB .300
 GB 0.0
 CX 35.00
 CY 20.00
 F1 7.787P
 F2 -.411P
 HZ/CN 58.585
 PPM/CN .234
 SR 2859.13

CY= 13.000 CX= 35.000 D1= 1.000
 RM. INTENSITY = .533 PPM = 23.00000 PP CONSTANT = .00000
 INTENS. LEVEL = .533 NOISE = .00000 SENS. LEVEL = .00000
 F1 = 1348.22 HZ = 5.3700 PPM F2 = 1222.63 HZ = 4.8779 PPM

CURSOR	FREQUENCY	PPM	INTENSITY
1	8335	1348.042	5.3894
2	8379	1334.617	5.2254
3	8393	1329.712	5.3160
4	8433	1318.123	5.2497
5	8443	1314.340	5.2246
6	8449	1306.989	5.2232
7	8472	1300.048	5.1974
8	8704	1293.809	5.1809
9	8720	1291.344	5.1434
10	8743	1284.644	5.1338
11	8755	1280.821	5.1204
12	8772	1273.725	5.1002
13	8782	1272.527	5.0874
14	8803	1264.121	5.0618
15	8826	1259.122	5.0339
16	8824	1256.802	5.0003
17	8870	1245.924	4.9911
18	8896	1239.238	4.9524
19	8920	1227.349	4.9049

RM. INTENSITY = .533 PPM = 23.00000 PP CONSTANT = .00000
 INTENS. LEVEL = .533 NOISE = .00000 SENS. LEVEL = .00000
 F1 = 1219.84 HZ = 4.8748 PPM F2 = 790.76 HZ = 3.1614 PPM

CURSOR	FREQUENCY	PPM	INTENSITY
1	9093	1177.298	4.7077
2	9098	1174.287	4.7024
3	9101	1173.170	4.6982
4	9104	1172.493	4.6929
5	9122	1168.724	4.6721
6	9144	1153.427	4.6194
7	9171	1133.451	4.6114
8	10132	891.169	3.5437
9	10147	886.442	3.5439
10	10066	897.622	3.5437
11	10084	892.379	3.4996
12	10100	870.218	3.4794
13	10117	843.323	3.4393
14	10120	844.274	3.4357
15	10134	840.004	3.4382

RM. INTENSITY = 1.237 PPM = 23.00000 PP CONSTANT = .00000
 INTENS. LEVEL = 1.237 NOISE = .00000 SENS. LEVEL = .00000
 F1 = 287.82 HZ = 2.3200 PPM F2 = 131.36 HZ = .5240 PPM

CURSOR	FREQUENCY	PPM	INTENSITY
1	11099	543.432	2.2404
2	11113	541.234	2.2442
3	11141	533.423	2.2094
4	11147	530.934	2.2024
5	11313	500.117	1.9994
6	11344	490.225	1.9400
7	11342	483.343	1.9403
8	11377	480.681	1.9217
9	11434	463.791	1.8200
10	11443	459.913	1.8387
11	11463	453.940	1.8148
12	11478	444.974	1.7989
13	11490	444.230	1.7800
14	11589	415.994	1.6431
15	11602	412.078	1.6474
16	11611	409.416	1.6348
17	11623	405.718	1.6220
18	11633	402.534	1.6094
19	11692	386.439	1.5378
20	11717	374.994	1.5072
21	11723	374.948	1.4991
22	11723	372.195	1.4880
23	11761	363.531	1.4334
24	11798	352.137	1.4078
25	11809	346.834	1.3944
26	11842	332.718	1.3502
27	11867	323.022	1.2998
28	11894	312.895	1.2499
29	11902	319.247	1.2775
30	11912	317.235	1.2695
31	11947	304.711	1.2242
32	11980	296.437	1.1860
33	11990	293.580	1.1737
34	12003	289.743	1.1584
35	12025	283.007	1.1314
36	12022	274.373	1.0977
37	12080	264.564	1.0377
38	12098	260.437	1.0429
39	12124	252.772	1.0184
40	12147	243.686	.9823
41	12147	239.437	.9880
42	12200	227.997	.9113
43	12223	222.417	.8892
44	12244	214.148	.8445
45	12250	214.242	.8349
46	12274	206.886	.8271
47	12282	204.572	.8179
48	12299	199.270	.7971
49	12304	197.848	.7910
50	12320	193.048	.7718
51	12375	180.407	.7322
52	12347	185.742	.7423
53	12405	167.222	.6498
54	12418	163.047	.6319
55	12424	161.141	.6442

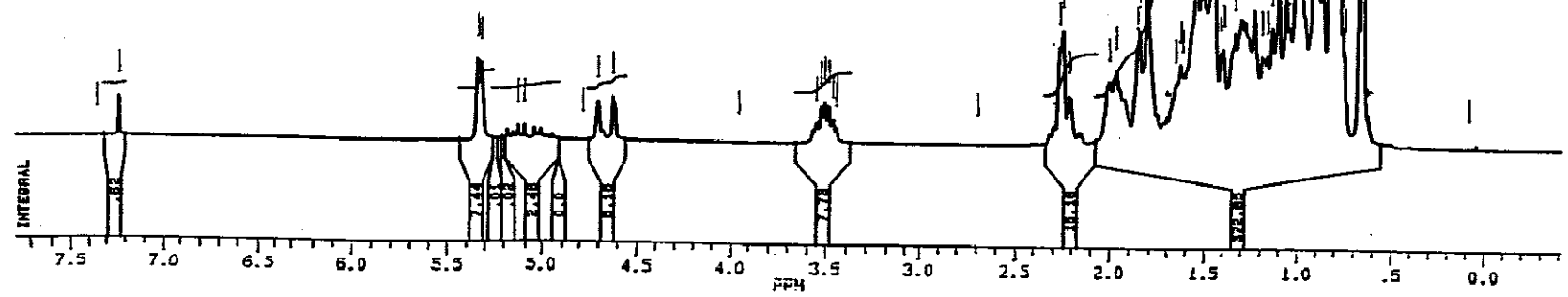


Figura 62. Espectro de ¹H-RMN de la Fracción II.b

#	CURSOR	FREQUENCY	PPM	INTENSITY
1	5105	7427.050	147.5866	.975
2	5576	7085.310	140.7958	4.611
3	5753	6956.150	138.2291	1.145
4	6366	6511.032	129.3840	.995
5	6899	6123.548	121.6841	5.814
6	7617	5601.715	111.3145	1.058
7	9950	3906.667	77.6312	13.228
8	9980	3884.768	77.1962	1.119
9	9994	3874.724	76.9966	13.341
10	10038	3842.760	76.3614	13.048
11	10354	3613.446	71.9046	9.178
12	11387	2862.771	56.8876	2.521
13	11592	2858.486	56.8024	6.226
14	11441	2823.646	56.1101	4.392
15	11447	2819.157	56.0209	1.447
16	11779	2577.732	51.2234	2.093
17	11850	2526.396	50.2033	5.775
18	11896	2492.691	49.5335	2.207
19	12172	2321.043	46.1226	2.448
20	12394	2131.026	42.3467	11.171
21	12401	2126.308	42.2529	1.651
22	12530	2032.188	40.3826	1.127
23	12569	2003.883	39.8202	5.568
24	12576	1999.092	39.7250	1.989
25	12744	1876.782	37.2945	7.770
26	12797	1838.270	36.5292	5.371
27	12815	1825.430	36.2740	3.512
28	12823	1819.386	36.1539	.715
29	12865	1788.797	35.5461	2.627
30	12973	1710.116	33.9826	2.797
31	12993	1695.918	33.7004	2.235
32	13115	1607.083	31.9352	14.113
33	13123	1601.033	31.8149	2.563
34	13151	1595.303	31.7011	7.107
35	13271	1493.807	29.6842	.728
36	13287	1482.282	29.4552	1.692
37	13315	1461.778	29.0477	1.843
38	13334	1447.860	28.7712	1.519
39	13372	1420.356	28.2246	3.992
40	13377	1416.908	28.1561	2.142
41	13490	1334.603	26.5206	3.844
42	13570	1276.795	25.3718	1.658
43	13643	1223.217	24.3072	5.890
44	13728	1161.702	23.0848	2.572
45	13865	1062.127	21.1061	8.044
46	13880	1051.395	20.8928	1.105
47	13970	985.836	19.5901	3.412
48	13984	975.418	19.3830	7.665
49	14011	956.312	19.0034	3.810
50	14015	953.521	18.9479	2.245
51	14022	948.160	18.8414	3.502
52	14035	938.925	18.6578	1.824
53	14089	899.492	17.8742	.809
54	14475	619.010	12.3007	2.742
55	14492	606.576	12.0536	3.058
56	14506	596.576	11.8549	5.358

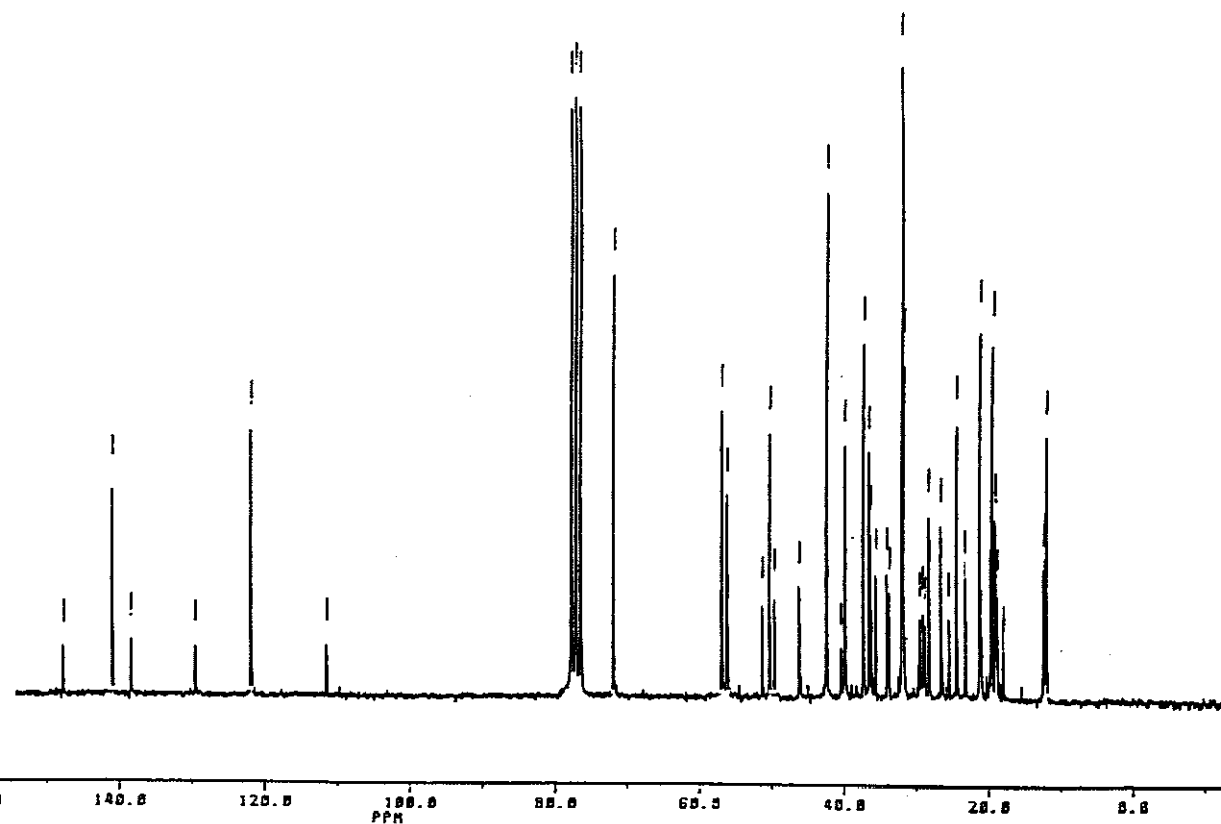


Figura 63. Espectro de ^{13}C -RMN de la Fracción II.b

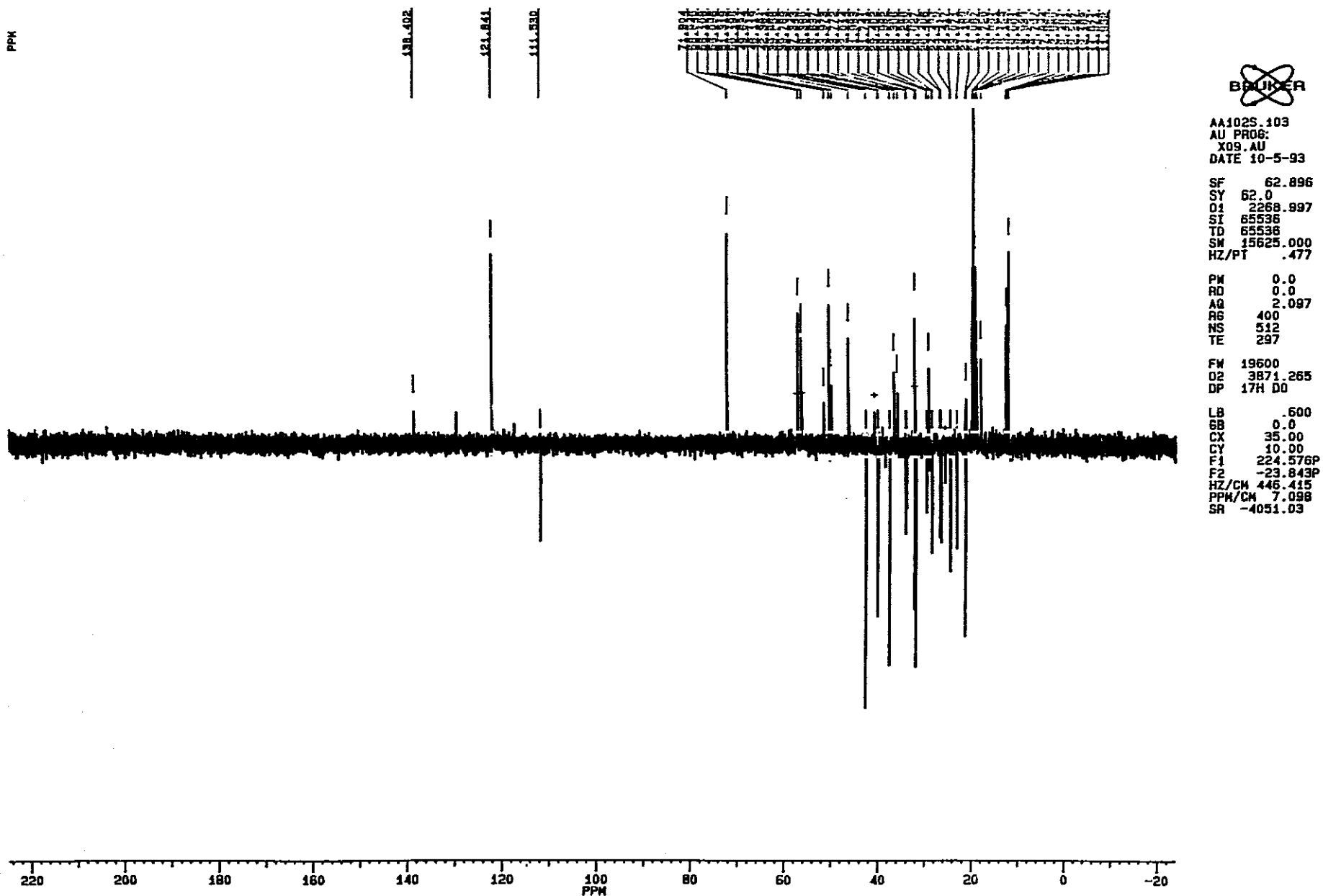


Figura 64. DEPT de la Fracción II.b

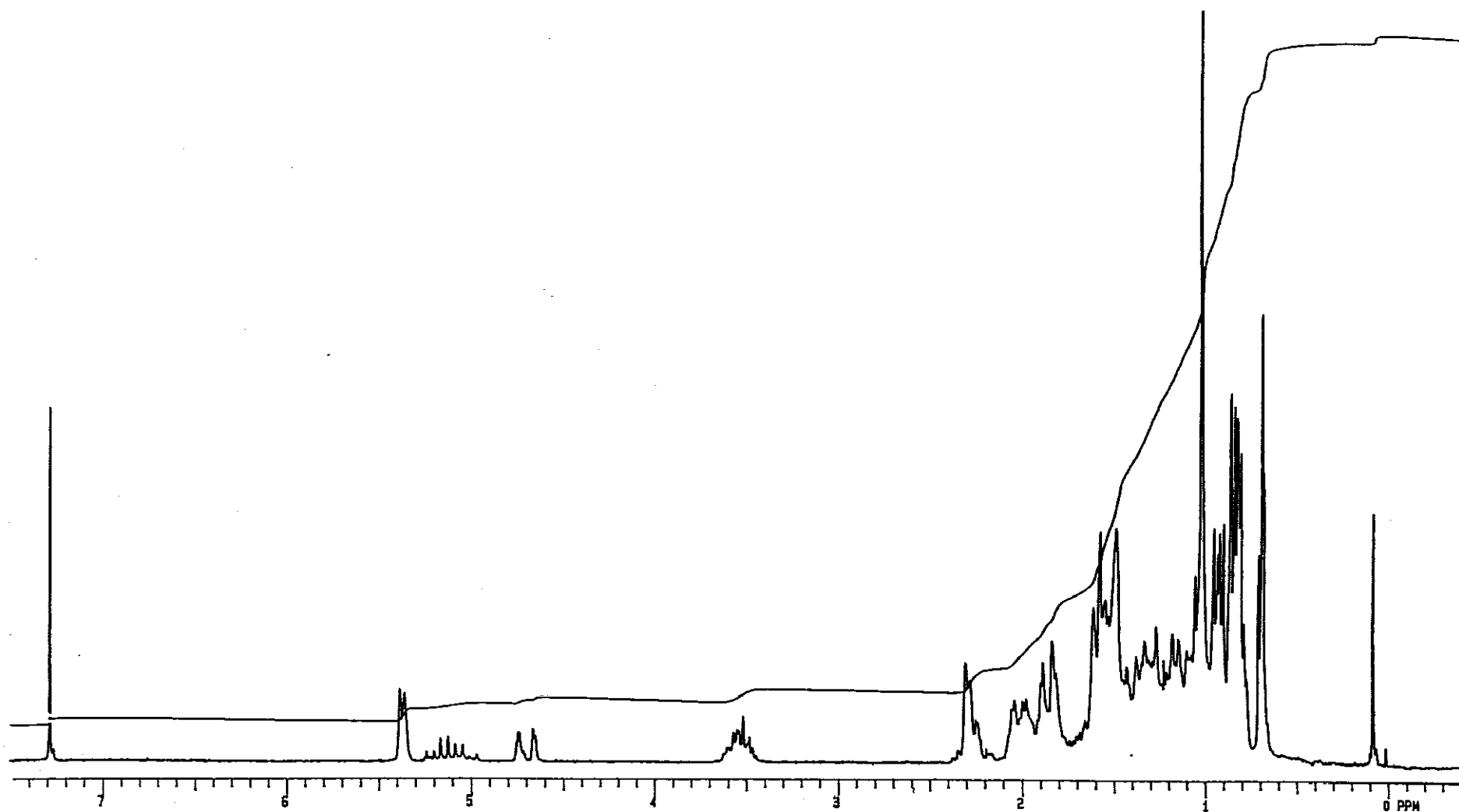


Figura 65. Espectro de ^1H -RMN del derivado no acetilado de la Fracción II.b

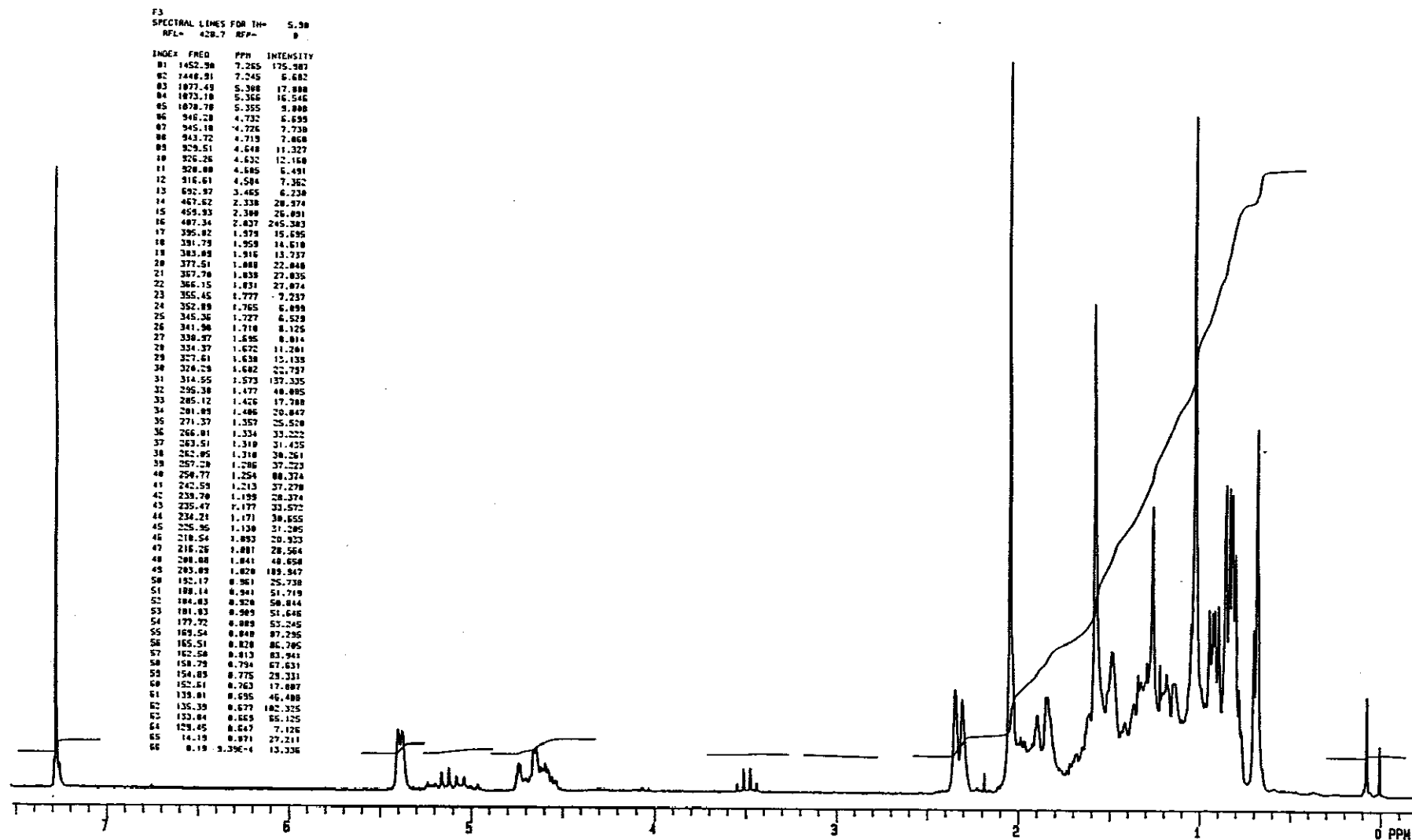


Figura 66. Espectro de ^1H -RMN del derivado acetilado de la Fracción II.b

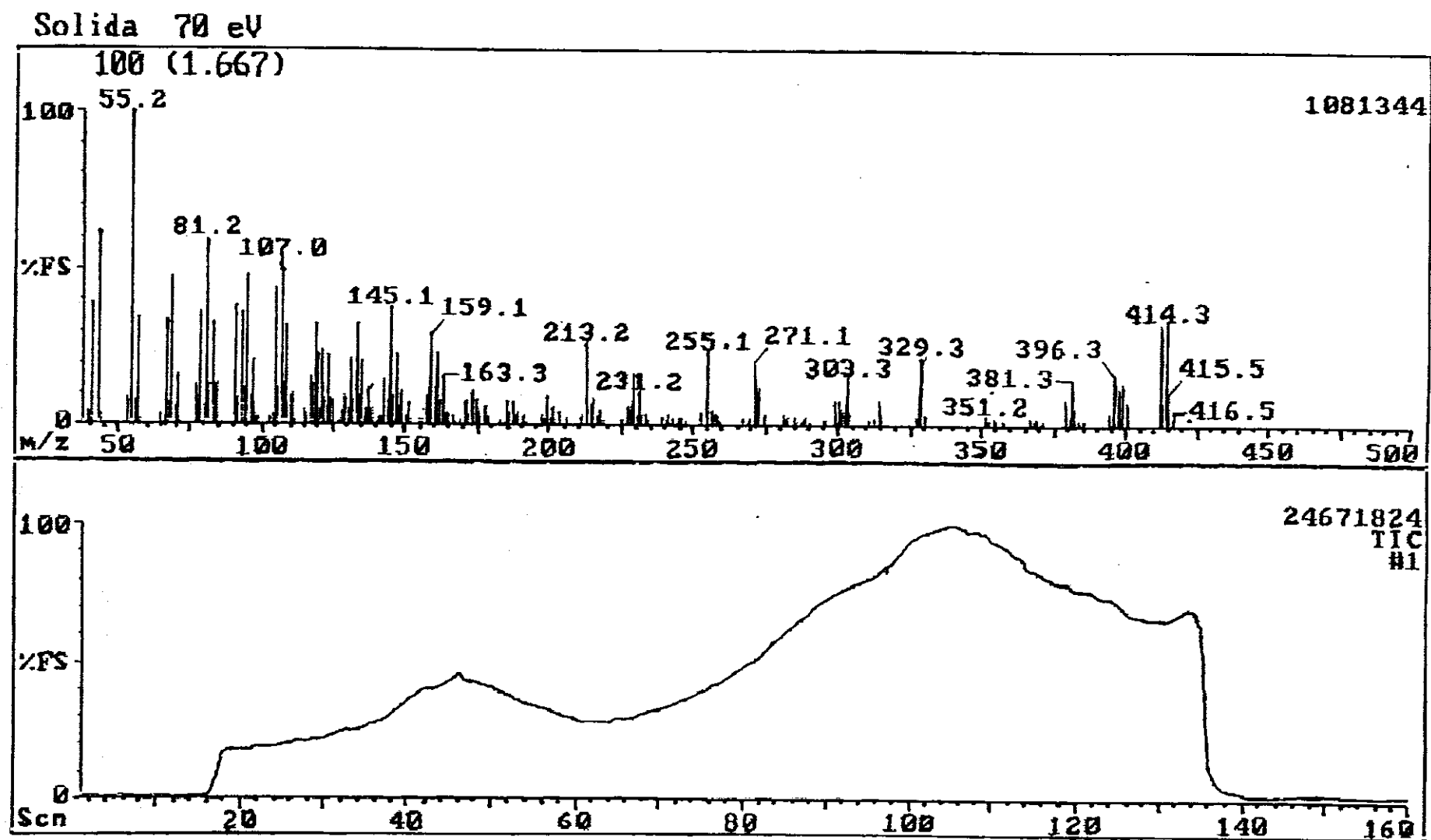


Figura 67. CG/EM de la Fracción II.b

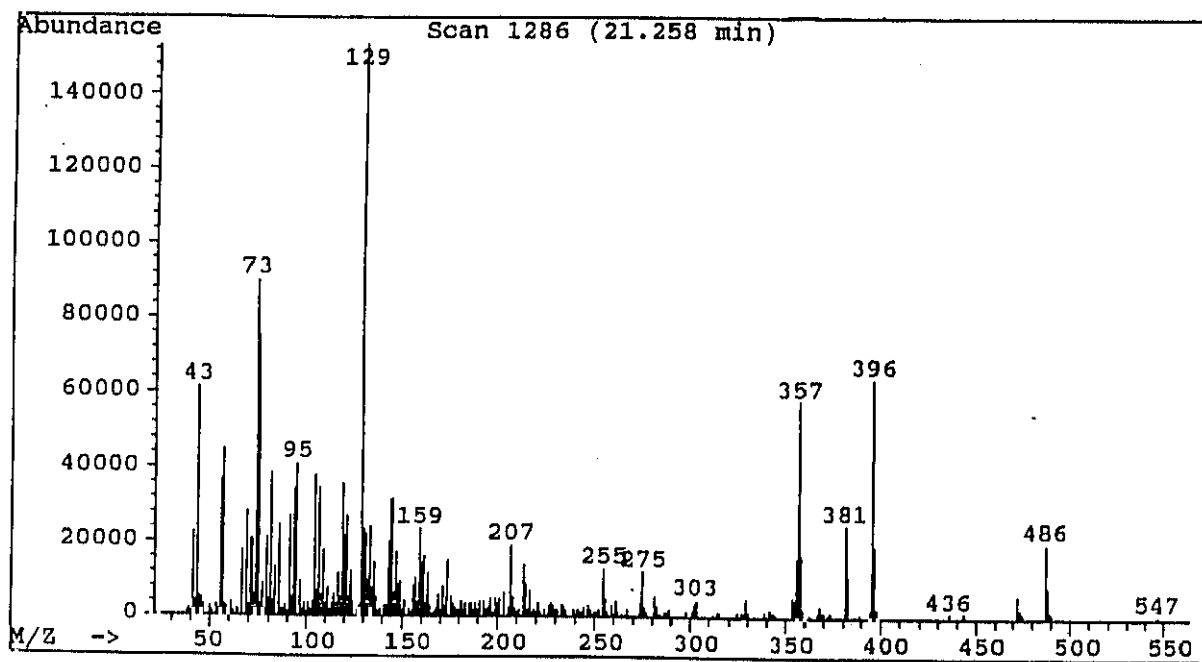
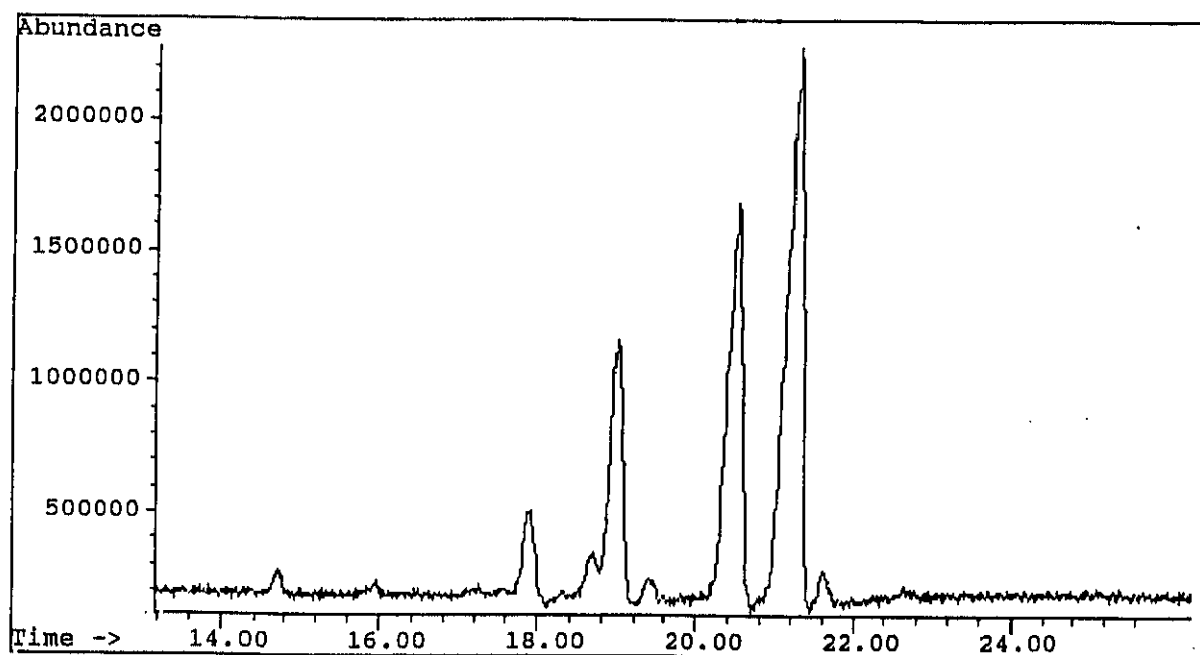
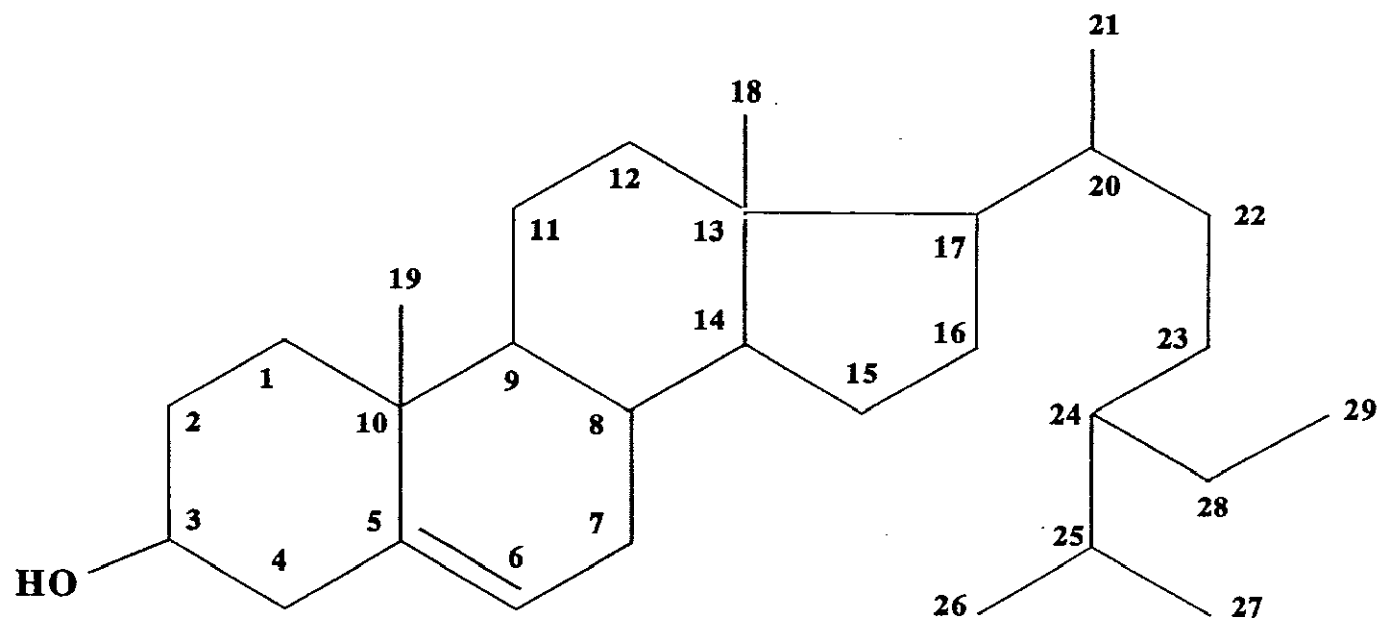


Figura 68. Espectro de Masas de la Fracción II.b,
picos 3, 4 y 5 constituyen el 90% de la muestra



3-hidroxi-5-estigmasteno

Figura 69. Estructura común propuesta para los constituyentes de la Fracción II.b

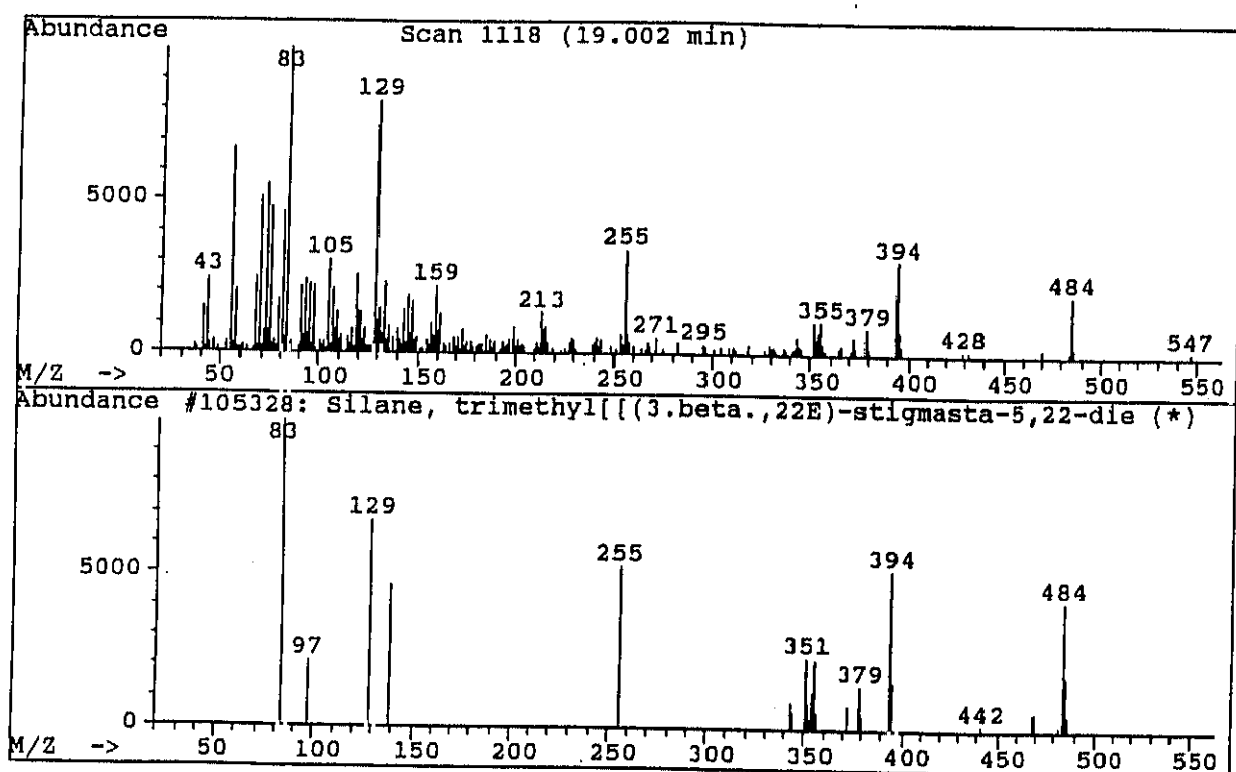


Figura 70. Espectro de Masas de II.b, pico 3,
propuesto como 3 β -hidroxi-22E-5,22-estigmastadieno

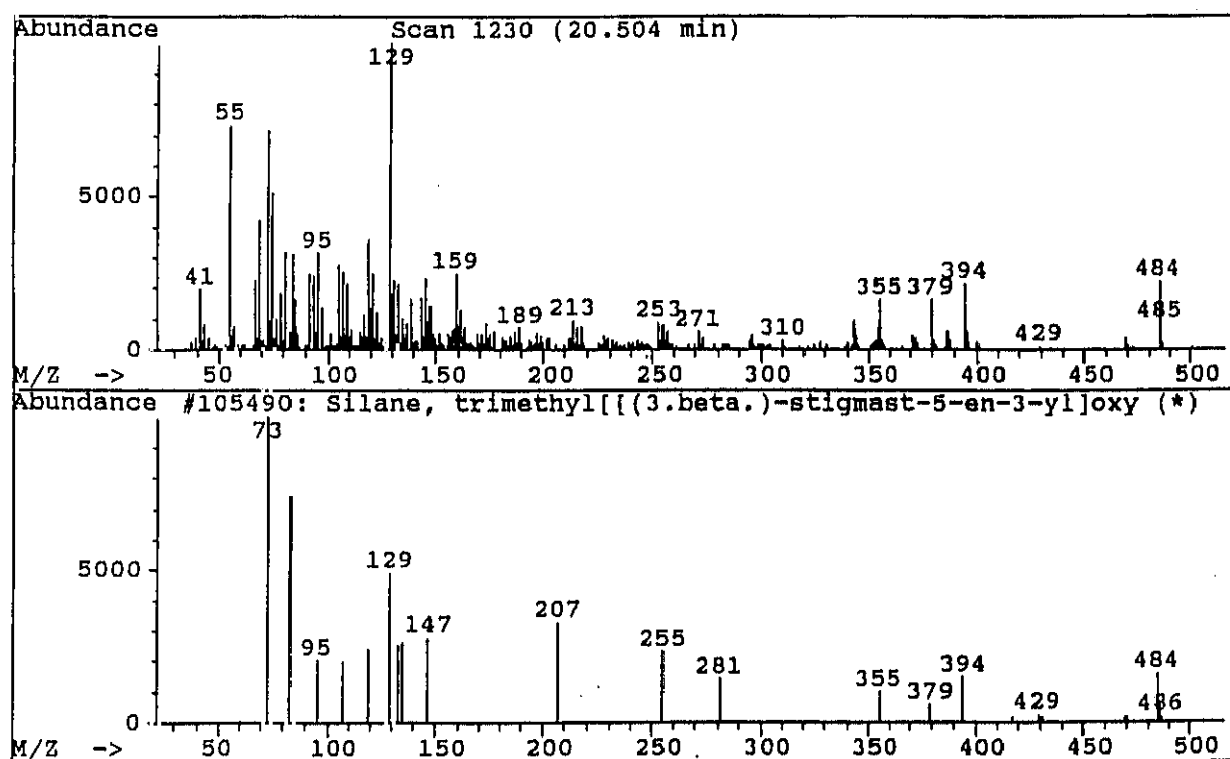


Figura 71. Espectro de Masas de II.b, pico 4,
propuesto como 3 β -hidroxi-5-estigmastadieno

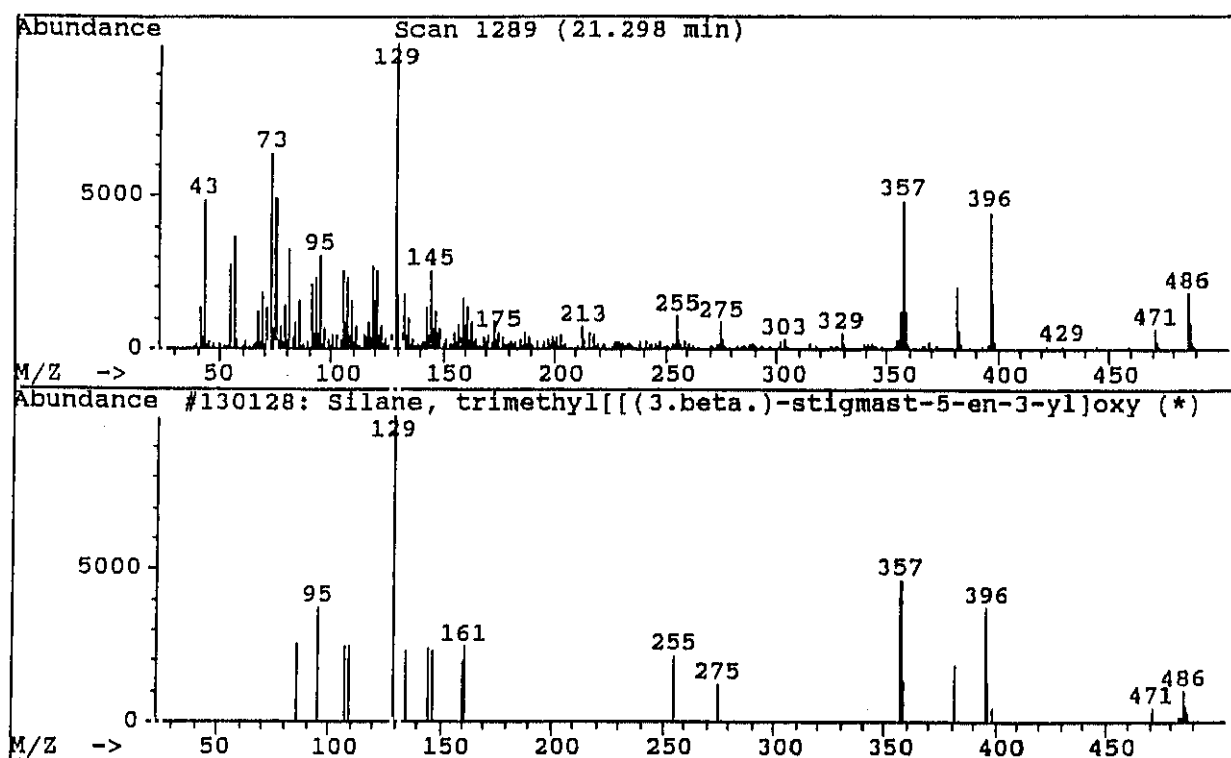


Figura 72. Espectro de Masas de II.b, pico 5,
propuesto como 3 β -hidroxi-5-estigmasteno

FRACCIÓN II.c

La Fracción II.c, obtenida a partir del extracto hexánico de la especie *Teucrium buxifolium*, presenta un complejo espectro de protón (Figuras 73 y 74), con señales a δ 5.3-5.0ppm (Figura 75), que indican que podría tratarse de olefinas, así como numerosas señales entre 2-0.6ppm. Se realizó el COSY de la muestra (Figuras 76 y 77), con el fin de obtener mayor información sobre la misma.

En el espectro de protón se observan señales centradas aproximadamente a δ 5.2ppm y δ 4.6ppm, que podrían ser asignados a protones olefínicos. Otra señal centrada a δ 3.1 se podría asignar a un protón geminal de hidroxilo y los protones olefínicos, por tanto este hidroxilo no es del tipo alílico.

Esta Fracción II.c muestra en su espectro de masas (Figura 78) un ion molecular a $m/z=426$, lo que hace suponer que se trata de una sustancia con fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ y por tanto, un posible triterpeno. Sin embargo, el espectro de 1H -RMN indicaba que el producto no era puro.

Un estudio de gases-masas de los derivados sililados indica la presencia de varias sustancias en la muestra (Figura 79), fundamentalmente tres (Figuras 80, 81 y 82).

El espectro de masas del componente principal de esta mezcla muestra el fragmento principal a $m/z=218$, que corresponde con la fragmentación esperada de los triterpenos tipo β -amirina, que al poseer una insaturación entre C12 y C13, dan lugar a una transposición del tipo McLafferty, que consiste en una reacción retro-Diels-Alder [79], tal y como se representa en la Figura 83, correspondiendo el fragmento principal a $m/z=218$. Se puede decir que el fragmento principal debe ser del tipo β -amirina.

Los resultados reseñados anteriormente sobre el espectro de 1H , estarían también de acuerdo con que estas sustancias posean el esqueleto de α y β -amirina, por lo que es muy probable que la Fracción II.c sea una mezcla de α y β -amirina, fundamentalmente (Figura 84).

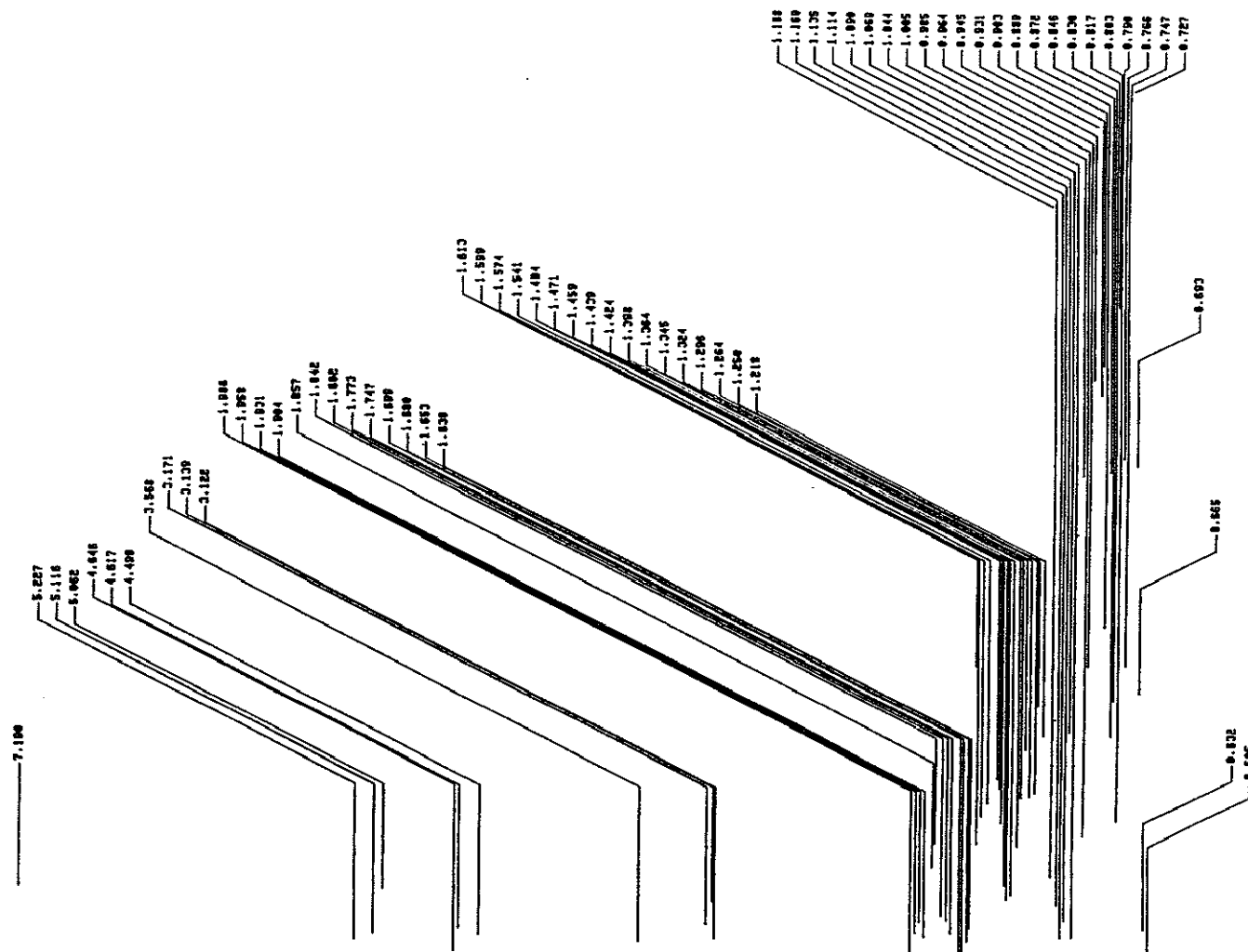


Figura 73. Espectro de ^1H -RMN de la Fracción II.c

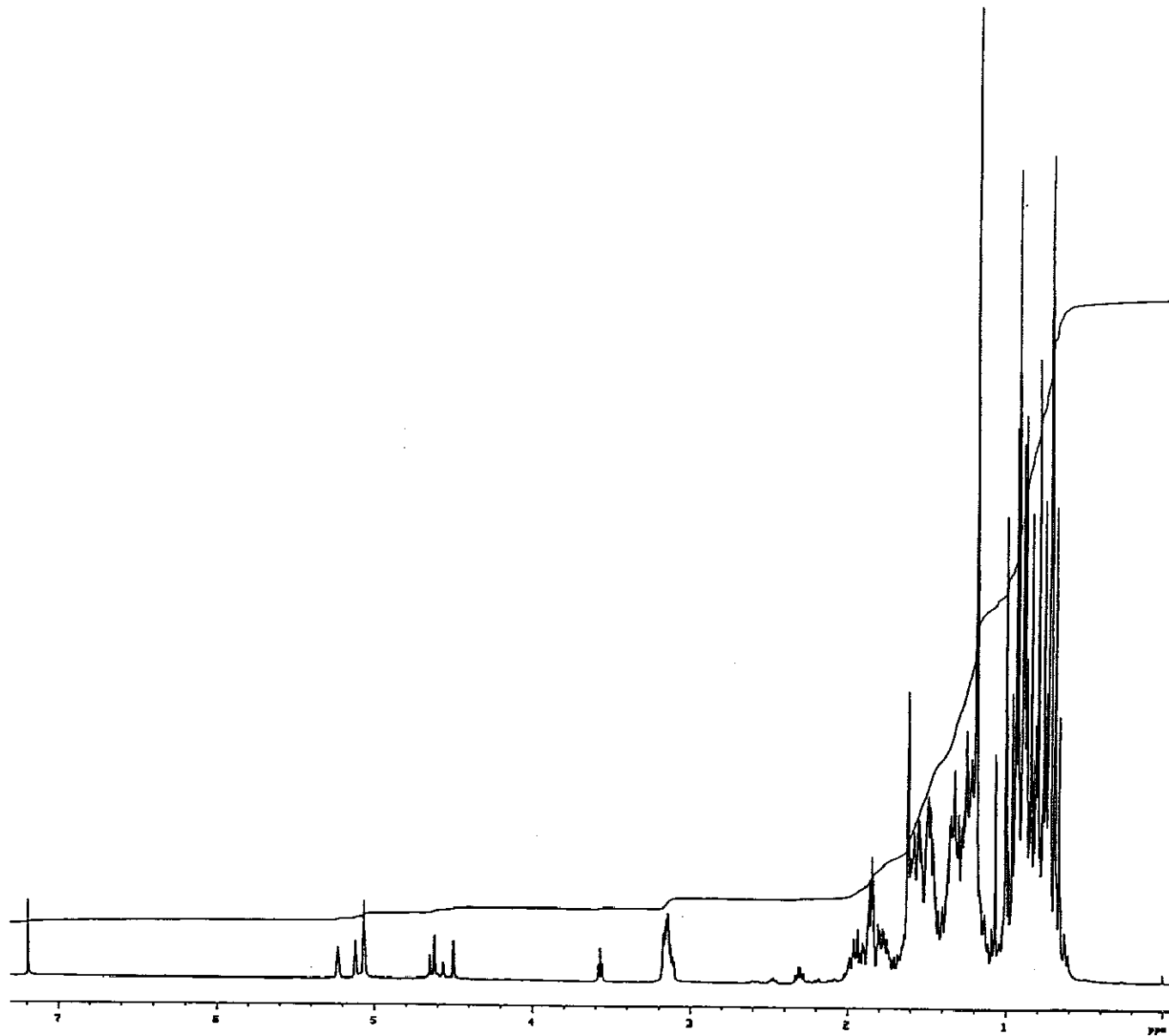


Figura 74. Espectro de ^1H -RMN de la Fracción II.c (cont.)

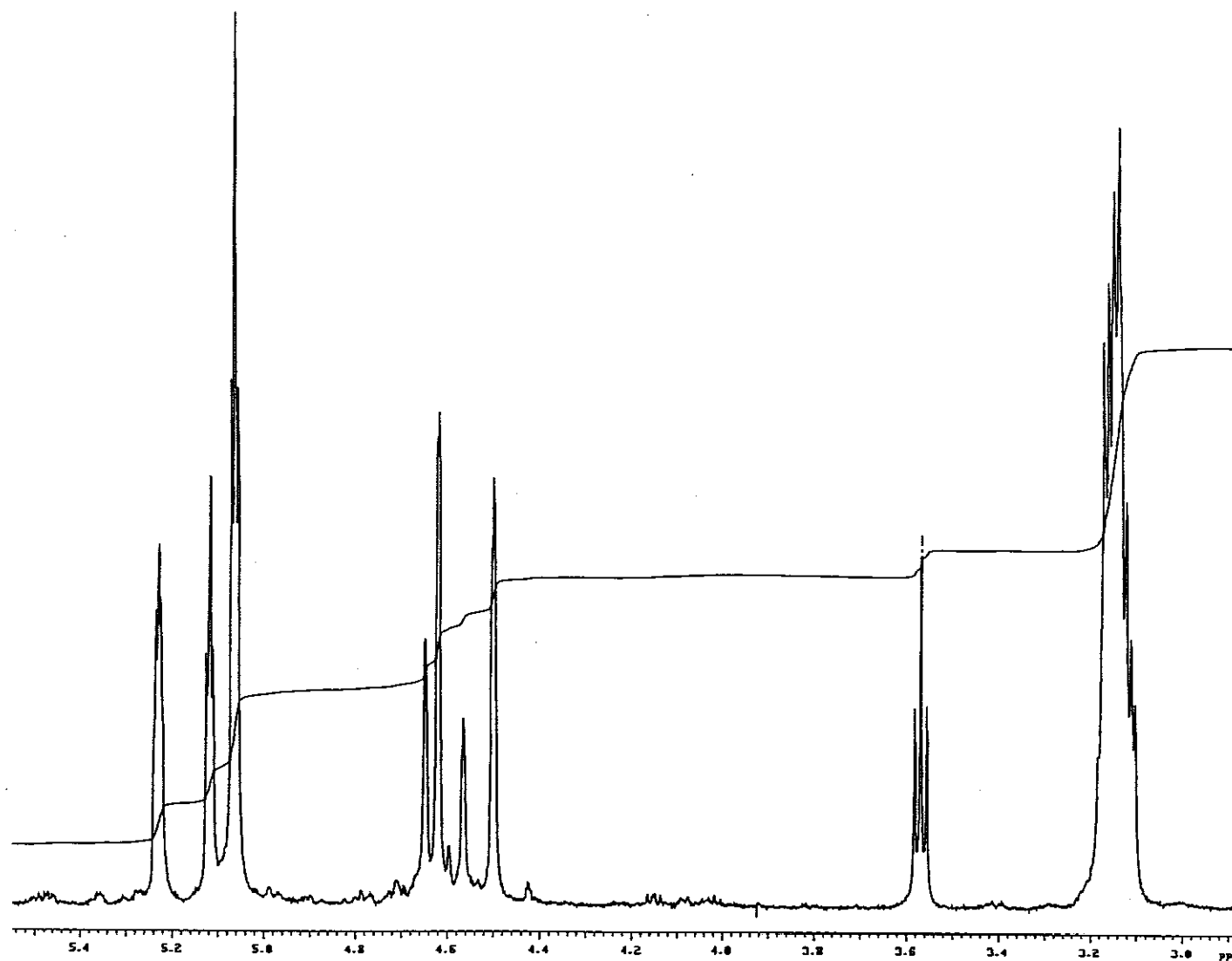


Figura 75. Espectro de ^1H -RMN de la Fracción II.c, ampliado

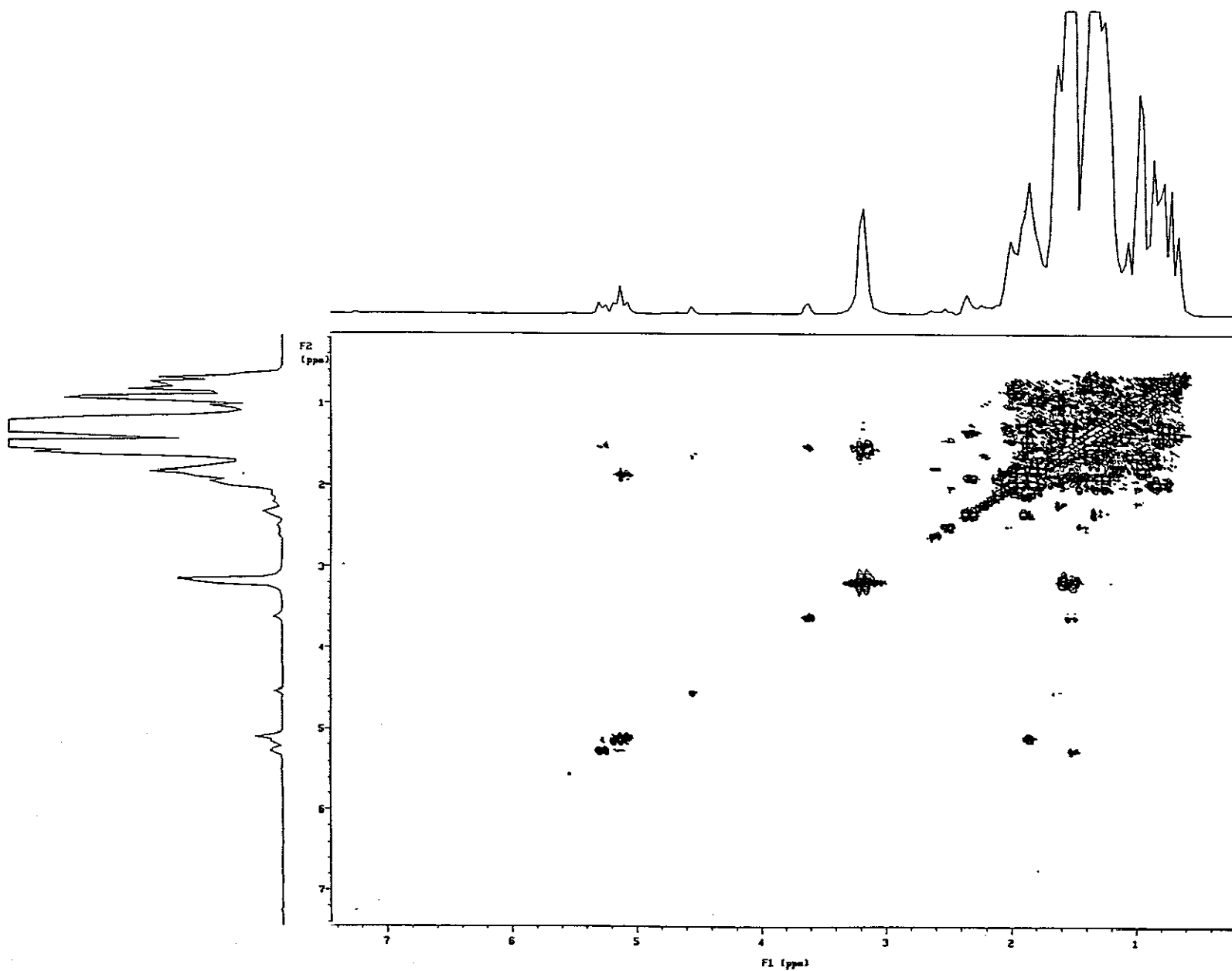


Figura 76. COSY de la Fracción II.c

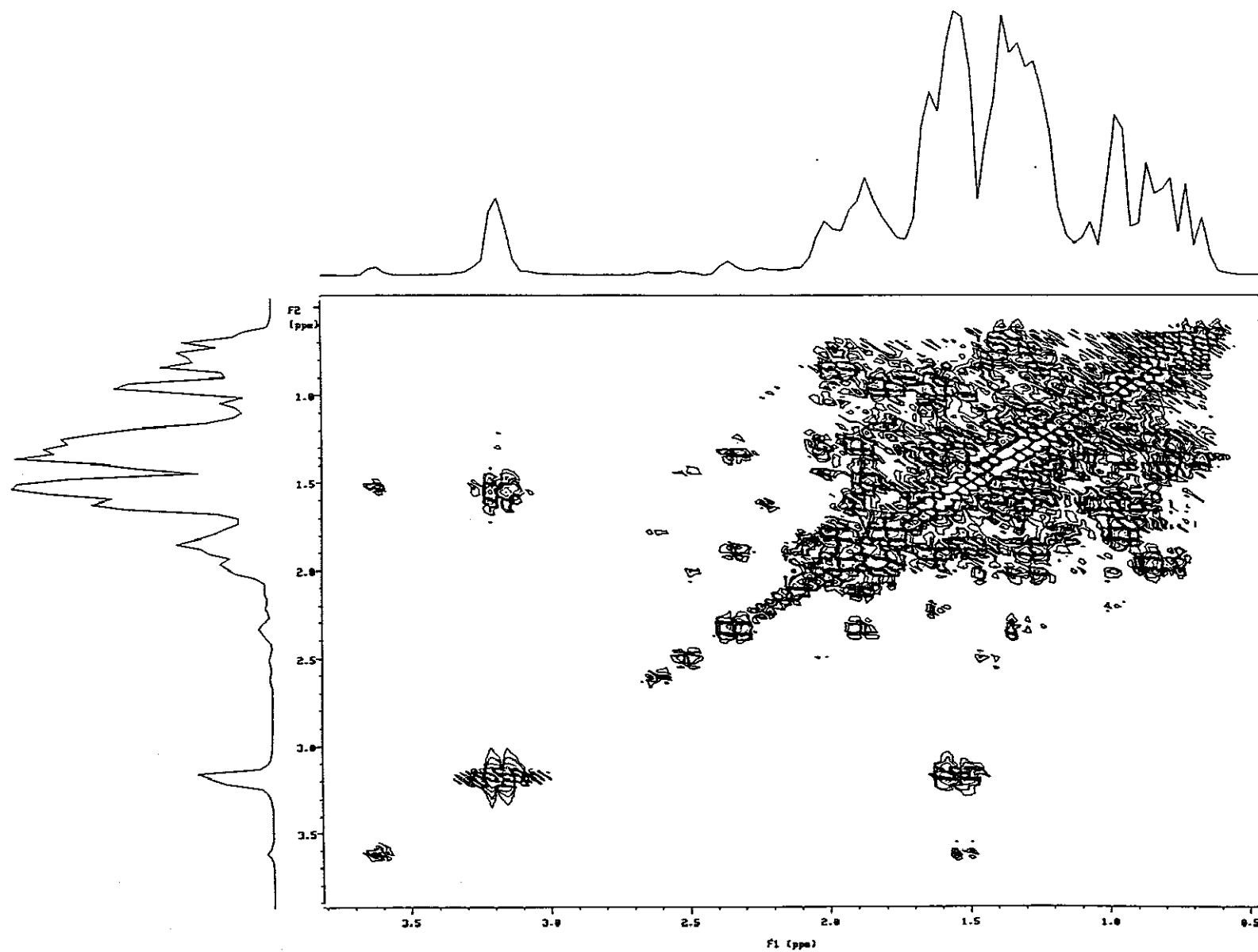


Figura 77. COSY de la Fracción II.c

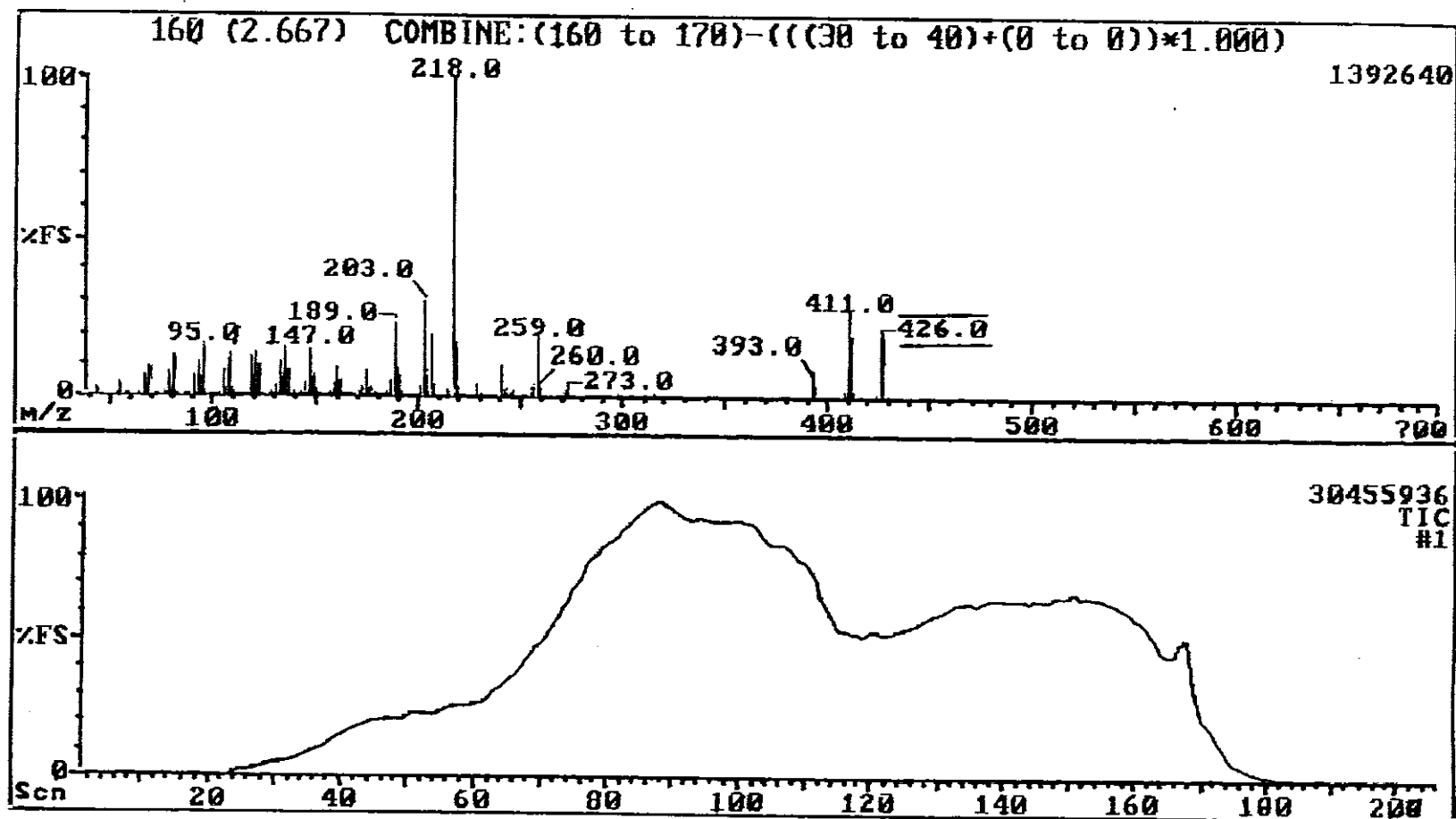


Figura 78. Espectro de masas de la Fracción II.c, presenta un ion molecular a $m/z=426$

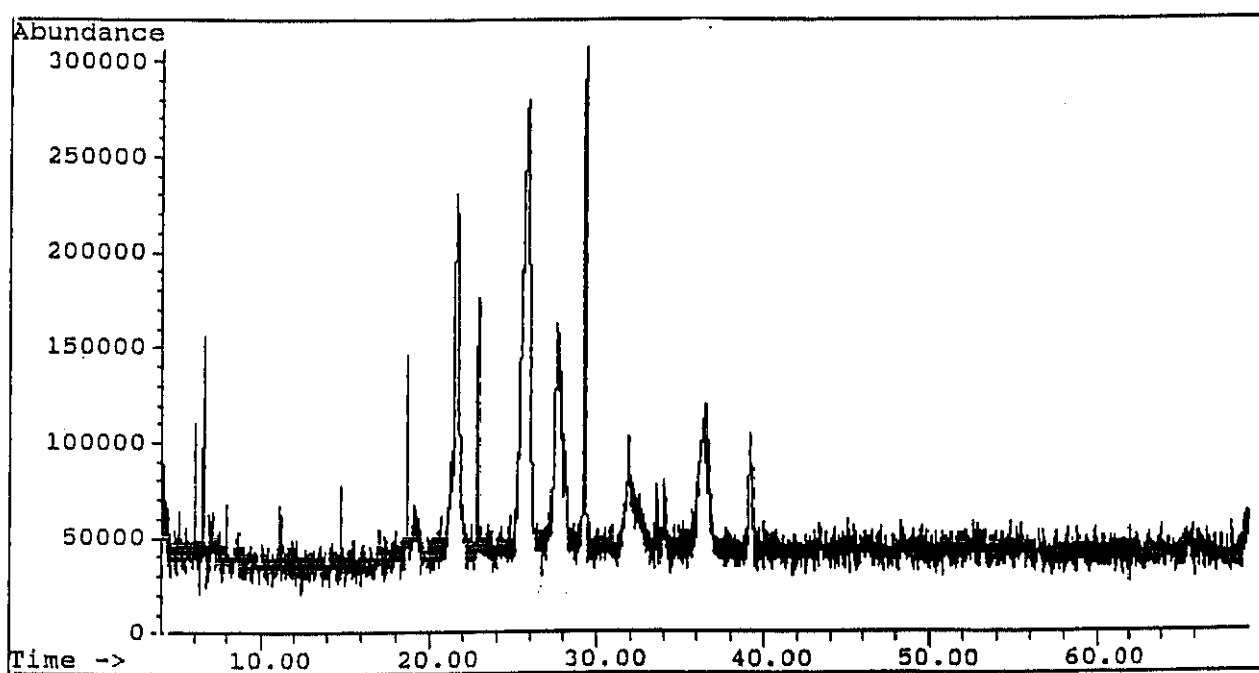


Figura 79. CG/EM de la Fracción II.c,
picos fundamentales señalados como 1, 2 y 3

Library Searched :
Quality : 90
ID : Silane, trimethyl[[(3.beta.)-olean-12-en-3-yl]oxy]-

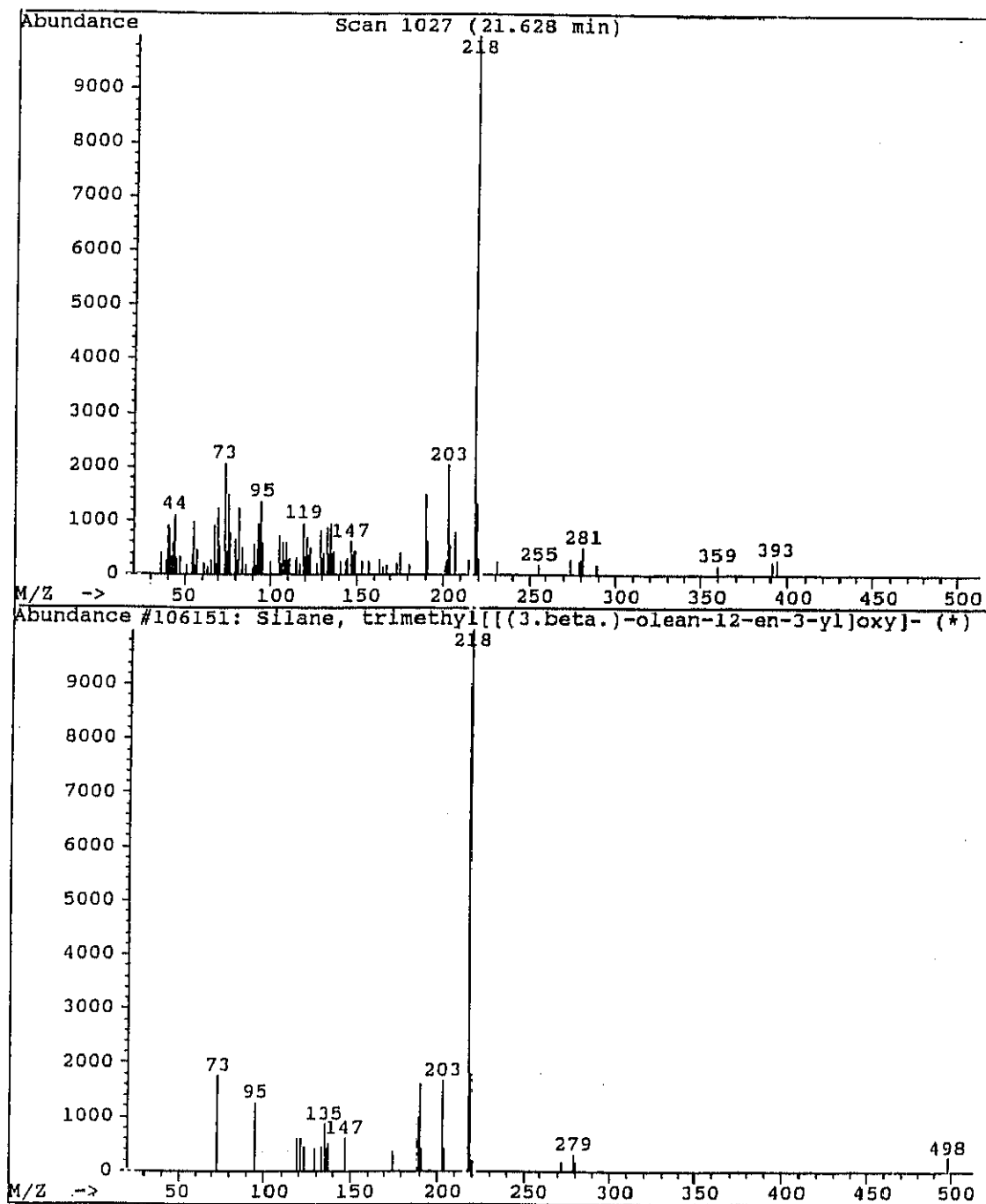


Figura 80. Espectro de Masas de II.c, pico 1

Library Searched :
Quality : 90
ID : Silane, trimethyl[[(3.beta.)-olean-12-en-3-yl]oxy]-

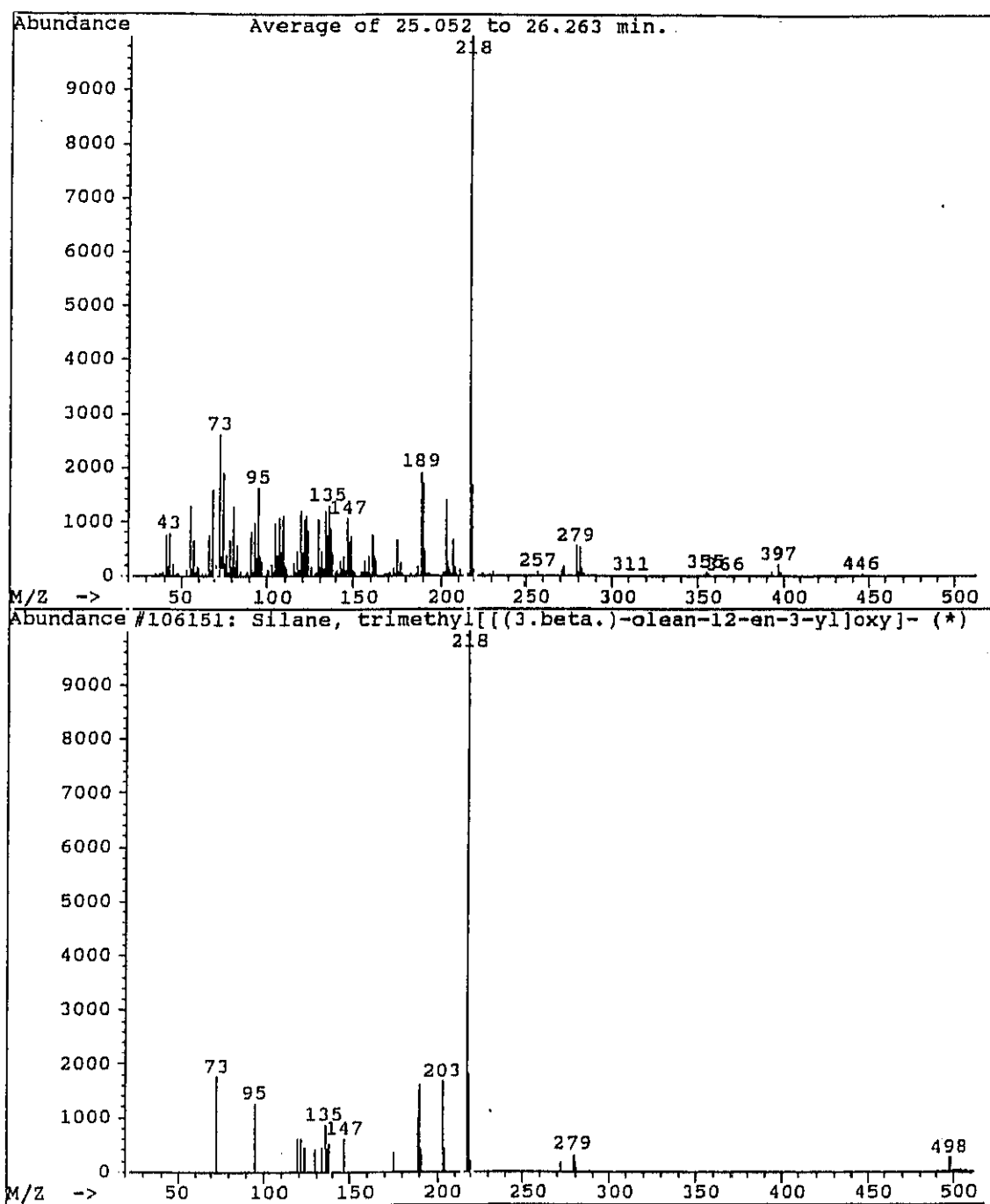


Figura 81. Espectro de Masas de II.c, pico 2

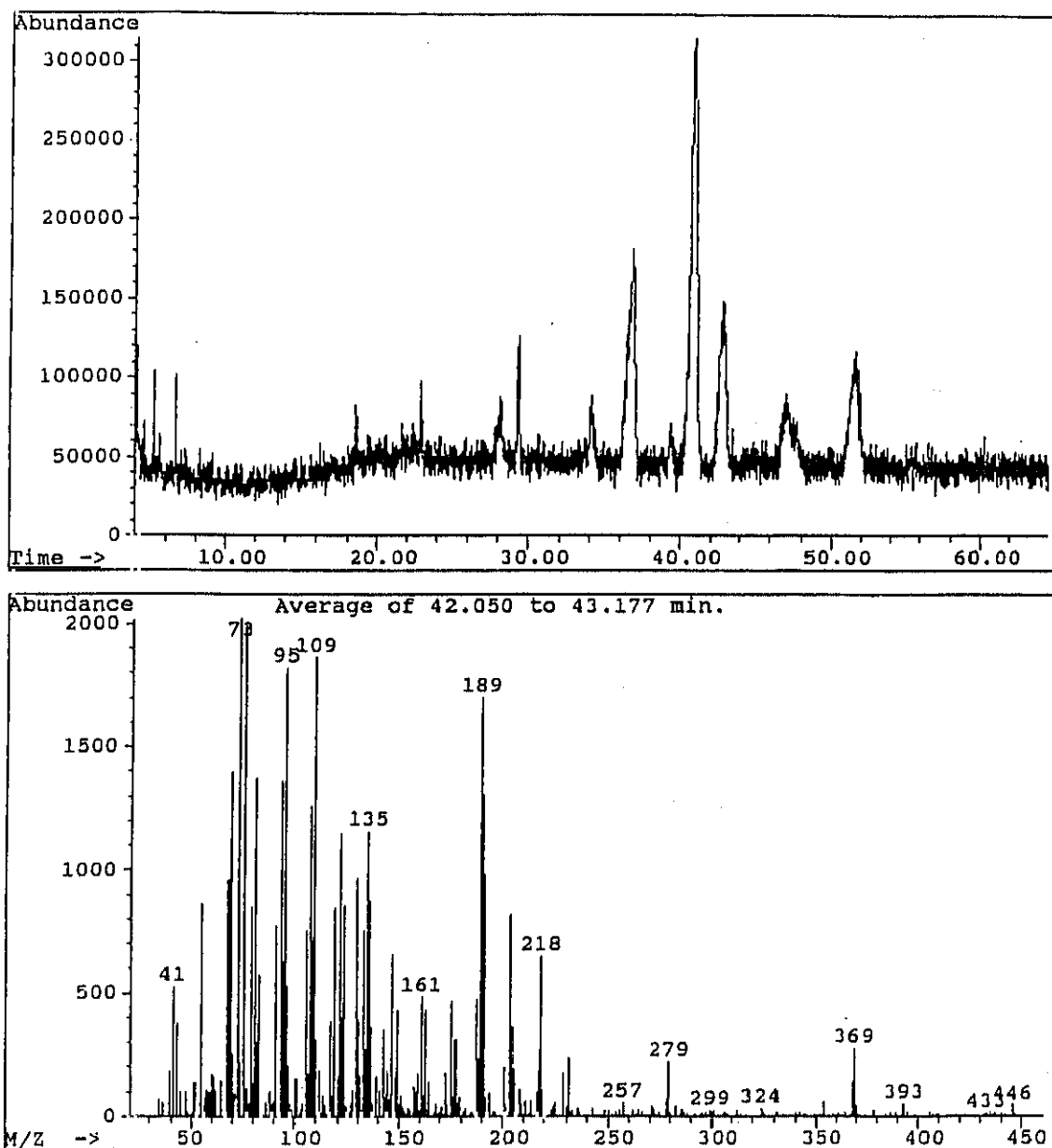


Figura 82. Espectro de Masas de II.c, pico 3

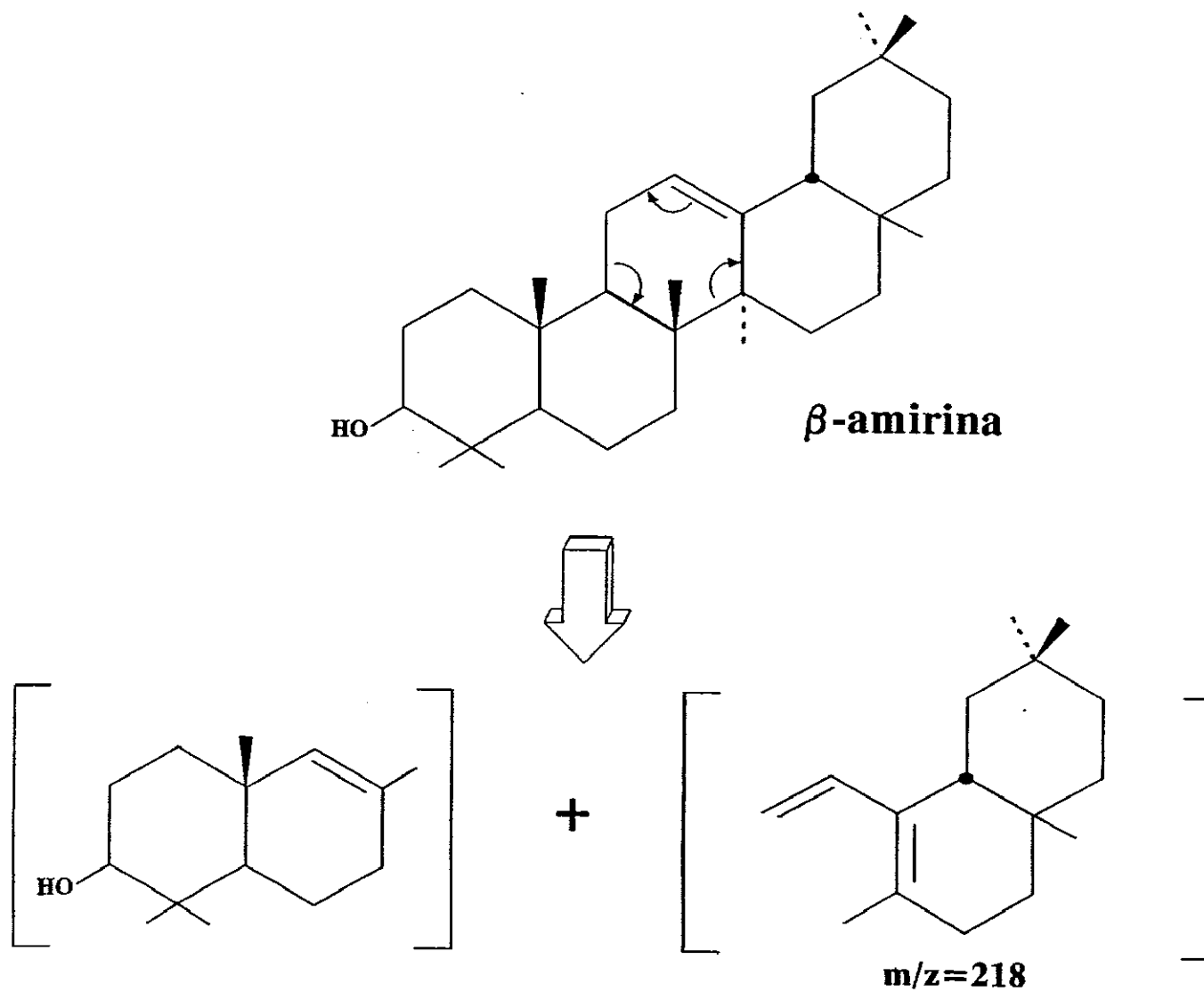


Figura 83. Transposición de McLafferty

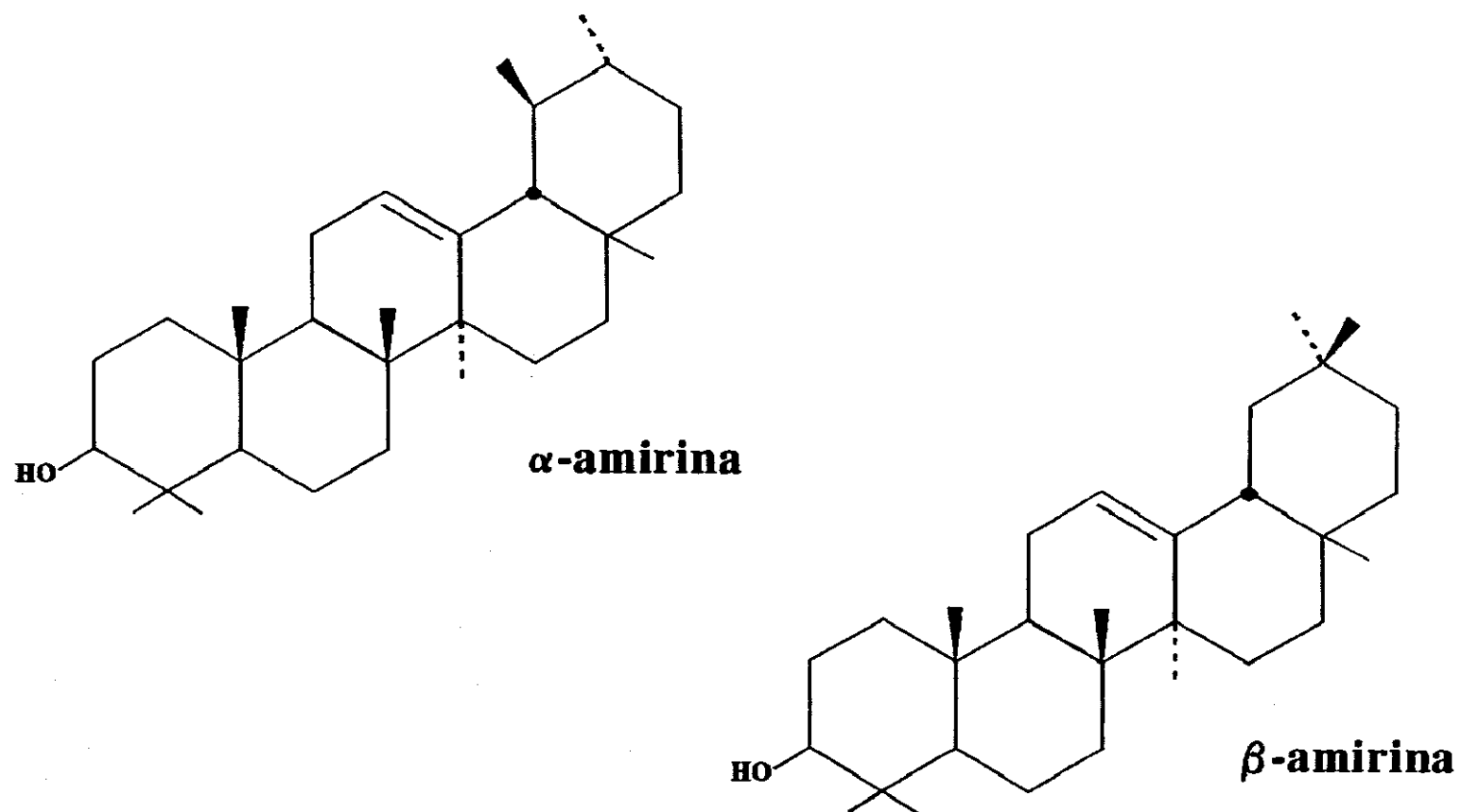


Figura 84. Estructuras de α y β -amirina, probables constituyentes de la Fracción II.c

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

Los procesos de fraccionamiento cromatográfico llevados a cabo con el extracto hexánico de la especie *Teucrium buxifolium* han dado lugar a la purificación de varias fracciones, tres de las cuales han sido sometidas a estudios de elucidación estructural. Éstos proporcionaron la siguiente información:

* La Fracción II.a está constituida por tres compuestos estructuralmente relacionados entre sí, en la proporción {1:6:1}. El componente principal, de peso molecular 222 y fórmula $C_{15}H_{26}O$, corresponde al sesquiterpeno 8-hidroxi-4(15)-eudesmeno, en el que la unión de anillos debe ser *trans*.

Las dos pequeñas impurezas deben corresponder a un eudesmano diinsaturado (PM 220) y un eudesmano dihidroxilado (PM 238).

En el género *Teucrium* se constata la presencia de sesquiterpenos formando parte de los componentes de los aceites esenciales [63,132,370,351,352]. Así como han sido aislados sesquiterpenos del grupo de los guaiananos [49], valencanos [290] y muy recientemente, se ha publicado la presencia de derivados del eudesmano en la especie *Teucrium heterophyllum* [100], aunque la estructura de estos últimos no parece coincidir con la del 8-hidroxi-4(15)-eudesmeno, aislado en el desarrollo experimental de esta Memoria.

* La Fracción I.b y la Fracción II.b presentan un mismo espectro de RMN, por lo que pueden ser consideradas como una sola. Esta fracción contiene varios compuestos, no siendo posible separarlos en columna, ni siquiera tras acetilación.

Dichos principios poseen estructura de esteroides de fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$ y $C_{29}H_{50}O$, PM 412 y 414, respectivamente.

Esta mezcla está formada por tres componentes mayoritarios que, en conjunto, representan más del 90% de la muestra, y han sido identificados como el 3 β -hidroxi-22E-5,22-estigmastadieno o estigmasterol, un 3 β -hidroxi-5-estigmastadieno y el 3 β -hidroxi-5-estigmasteno o β -sitosterol.

El β -sitosterol y el estigmasterol ya han sido aislados con anterioridad en el género *Teucrium* [55,100]. También han sido detectados otros compuestos pertenecientes a este mismo grupo químico de los fitoesteros, como el clerosterol [55,319], campesterol y brassicasterol [327].

* La Fracción II.c está constituida por más de un componente según los datos aportados por el espectro de ^1H -RMN, siendo en este caso, la espectrometría de masas la herramienta que más información ha proporcionado. El ion molecular a $m/z=426$ permite sospechar una fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, posiblemente correspondiente a un triterpeno.

El estudio de los trimetilsililderivados indica la presencia fundamentalmente de tres compuestos, proporcionando el componente principal un ion a $m/z=218$, típico de la fragmentación retro-Diels-Alder que sufren los oleananos, triterpenos pentacíclicos con una insaturación entre el carbono 12 y 13.

El fragmento principal que se observa en la EM, debe ser del tipo β -amirina, por lo que se deduce que la Fracción II.c puede ser una mezcla de α y β -amirina, fundamentalmente.

Dichos compuestos pertenecen al grupo de los triterpenos del tipo oleano, detectados en la familia *Labiatae*, generalmente junto a los ursanos [79], así como mezclas de α y β -amirina se han constatado en alguna especie del género *Teucrium* [100]. Es conocido que, en algunas ocasiones, estos triterpenos son cristalinos y su cristalización permite la purificación [79], y de hecho, en el caso de la Fracción II.c se observó cristalización espontánea, en forma de arborescencias, como ya se ha comentado.

Muchas veces los triterpenos son saponinas, y concretamente la α y β -amirina constituyen los representantes principales de dos de los tres grupos en que se clasifican las saponinas triterpénicas, ampliamente distribuidas en las Dicotiledóneas.

Estos principios químicos identificados en la especie *Teucrium buxifolium* son los componentes fundamentales de las Fracciones II.a, II.b y II.c, fracciones que han demostrado reducir activamente el proceso inflamatorio inducido por carragenina, en ratones, por lo que son responsables, al menos en parte, de la actividad antiinflamatoria de la especie objeto de estudio.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el fin de justificar, de forma científica, el uso popular que se hace de la especie *Teucrium buxifolium*, como paliativo de afecciones reumáticas y en todo tipo de inflamaciones, se abordó su estudio en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

De esta forma, enmarcado en una de las principales líneas de investigación de dicho Departamento, un screening preliminar de actividad antiinflamatoria, en el que estaba incluida, entre otras, la especie *Teucrium buxifolium*, demostró que dos de los extractos orgánicos de la citada especie presentaban un especial interés [9], animando a profundizar en su conocimiento, con la intención final del aislamiento y caracterización de los principios químicos responsables de sus propiedades farmacológicas.

El estudio se inició con una búsqueda bibliográfica acerca de su composición química y actividad farmacológica, pero la escasa información obtenida hizo preciso orientar dicha revisión hacia el género.

Según puede extraerse de la bibliografía consultada, las especies de *Teucrium* presentan una gran riqueza en compuestos terpénicos, constituyendo incluso fuente de diterpenos del tipo *neo-clerodano*. Así mismo, se intenta encontrar un patrón taxonómico relacionado con la composición en derivados flavónicos, siendo más abundantes las flavonas y apareciendo, de forma ocasional, algunos flavonoles, hecho poco usual en la familia *Lamiaceae*.

La especie objeto de estudio, *Teucrium buxifolium*, posee dos derivados *neo-clerodanos*, 19-acetilteugnafalina y 19-acetilteulepicina [243,289], así como diversos compuestos flavónicos [128].

Debido a que existían escasos datos concernientes a su composición química, se pensó que sería oportuno ampliar el conocimiento de su fitoquímica, llevando a cabo un análisis cualitativo, basado en reacciones

cualitativas de coloración, precipitación, fluorescencia y técnicas cromatográficas, todo ello con el fin de realizar una búsqueda más racionalizada de los principios activos.

El examen cualitativo de la composición de *Teucrium buxifolium* puso de manifiesto la presencia de los siguientes grupos químicos: azúcares, ácidos fenólicos, flavonoides, saponinas, compuestos de naturaleza esteroídica y resinas.

Las reacciones generales de caracterización resultaron negativas en el caso de los ensayos correspondientes a: mucílagos, cumarinas, antraquinonas, antocianos y leucoantocianos, heterósidos cardiotónicos, compuestos cianogénéticos, alcaloides y taninos.

En principio, la información proporcionada por la bibliografía, así como los resultados obtenidos en los ensayos fitoquímicos realizados, permiten sugerir que la actividad antiinflamatoria, atribuida en medicina popular al *Teucrium buxifolium*, podría estar debida a la presencia en el mismo de derivados terpénicos o compuestos de naturaleza flavónica, ya que se conocen representantes de ambos grupos químicos con actividad antiinflamatoria, en ocasiones no ulcógena.

Los datos aportados por la bibliografía, sobre la interesante composición química del género y los resultados arrojados por el screening fitoquímico de la especie *Teucrium buxifolium*, revelan una prometedora expectativa farmacológica.

A todo ello, se suma la importante información obtenida de la revisión bibliográfica del empleo en medicina tradicional, de especies afines y su validación a nivel científico; y por supuesto, el empleo popular de la especie, como poderoso agente en el tratamiento de afecciones reumáticas y otros procesos inflamatorios, así como el ensayo preliminar de actividad antiinflamatoria llevado a cabo.

Estas razones impulsaron a, una vez realizado el estudio fitoquímico de la especie objeto de estudio, abordar un análisis farmacológico más profundo de la misma, que en caso de confirmar su actividad antiinflamatoria, permitiría justificar el empleo popular.

En los ensayos realizados previamente en este Departamento, los extractos hexánico y metanólico de *Teucrium buxifolium* demostraron una notable actividad antiinflamatoria. Con el fin de corroborar estos resultados, se siguieron dos modelos experimentales, la artritis generalizada inducida por adyuvante de Freund y carragenina [209], en ratas, y el edema plantar agudo, en ratones [315,383].

De igual forma, se ensayó la actividad de la infusión de la especie, por ser ésta la forma de uso popular.

En los ensayos realizados se emplearon distintos lotes control, según el vehículo utilizado en los lotes problema, CMC/tween en el caso de los extractos y agua destilada para el liofilizado de la infusión. En ambos casos, es posible afirmar que el curso de la inflamación no se ve afectado por el vehículo, por lo que se concluye que estos vehículos no ejercen ninguna influencia en el desarrollo de los procesos inflamatorios experimentales inducidos: artritis generalizada y edema plantar agudo.

De igual forma, el patrón de referencia escogido en ambos protocolos experimentales fue la fenilbutazona, no viéndose afectada su actividad, en ningún caso, por el vehículo correspondiente, y ratificando plenamente su potencia como AINE de reconocido prestigio. Este fármaco posee una semivida elevada, por lo que es lógico esperar que en el modelo de artritis experimental mantenga su actividad durante toda la fase aguda, como de hecho sucede. De igual forma, la inhibición que presenta va aumentando a lo largo del proceso, manifestando una considerable actividad en la etapa tardía, incluso en el último día de la experiencia, en que ya no se administra el fármaco a los animales, debido a su farmacocinética de larga duración, que hace que se mantengan los niveles plasmáticos durante bastante tiempo.

En el protocolo experimental de edema plantar, la fenilbutazona reduce el proceso edematógeno con porcentajes de inhibición que van desde el 40 hasta más del 60%, con respecto al control. Los lotes que no reciben tratamiento presentan la máxima inflamación a las 5h, coincidiendo con la liberación de PG y el auge de la migración leucocitaria, ambos fenómenos inducidos por el agente flogístico, carragenina. Es precisamente en este periodo, cuando el fármaco de referencia manifiesta su máxima actividad, ratificando su mecanismo de acción relacionado con los metabolitos de la CO.

El extracto hexánico de *Teucrium buxifolium* corrobora los resultados previamente obtenidos en el modelo experimental de artritis generalizada inducida por adyuvante de Freund y carragenina, demostrando una interesante actividad antiinflamatoria, tanto en la fase aguda como crónica de la inflamación, con porcentajes de inhibición próximos o superiores al 50%, en la etapa tardía. En la etapa aguda de la artritis presenta una subida en su actividad a las 5h, lo que podría indicar que su mecanismo de acción quizá esté relacionado con la liberación de eicosanoides que se manifiesta por acción de la carragenina. Coincidiendo con esta observación, el extracto hexánico frente al edema plantar agudo en ratones, presenta una inhibición comprendida entre el 50 y 60%, con respecto al control, con máxima actividad a las 5h de la inducción del proceso edematógeno.

El extracto metanólico de esta misma especie, confirmando el screening preliminar realizado, inhibe el proceso de artritis experimental inducido en ratas, fundamentalmente en la fase crónica (entre el 50-60%), si bien no es tan activo en las primeras etapas de la inflamación. Por otro lado, superando incluso al fármaco de referencia, el extracto metanólico presenta destacados porcentajes de inhibición del edema plantar por carragenina, comprendidos entre el 70 y 80%, y de igual forma que el extracto hexánico con máxima actividad en el periodo de liberación de PG y LT.

La infusión de *Teucrium buxifolium*, tras ser sometida a un proceso de liofilizado, fue ensayada en los dos modelos experimentales citados, presentando incluso mayor actividad que los extractos orgánicos, frente a

la artritis inducida, con un comportamiento muy similar al presentado por el patrón de referencia. En la fase aguda de la artritis experimental, esta infusión reduce ya a las 3h el proceso inflamatorio, con porcentajes de actividad próximos o superiores al 40%. En la etapa crónica alcanza el 70%, justificando plenamente el uso de esta forma medicamentosa en la medicina tradicional, como paliativo de procesos artríticos. A su vez, inhibe notablemente el edema plantar por carragenina, con actividades del orden del 50-60%, respecto al control, a lo largo de todo el proceso flogístico inducido.

Por tanto, en el modelo experimental de artritis generalizada, los extractos hexánico y metanólico, de la especie objeto de estudio, han corroborado en los ensayos realizados, los resultados previamente obtenidos en este mismo Departamento. De igual forma, frente al edema plantar agudo ambos extractos reducen el proceso inflamatorio inducido, con satisfactorios porcentajes de inhibición. El liofilizado de la infusión de *Teucrium buxifolium* presenta una actividad destacada, de carácter similar al fármaco de referencia, incluso superior, en ambos protocolos experimentales.

Queda pues, justificado el empleo en medicina tradicional de la especie *Teucrium buxifolium*, endemismo valenciano de uso en afecciones reumáticas y otros transtornos que cursan con inflamación.

A la vista de los resultados del estudio fitoquímico, se sugería que el uso popular como antiinflamatorios podría ser debido a la presencia en la especie de compuestos de naturaleza terpénica o bien flavónica. De acuerdo con los ensayos de actividad antiinflamatoria realizados, los extractos hexánico y metanólico demuestran una notable reducción de los procesos inflamatorios inducidos experimentalmente.

Se puede hipotetizar que el extracto hexánico podría deber su actividad antiinflamatoria a compuestos de naturaleza terpénica. Estos derivados terpenoides con toda probabilidad han sido arrastrados por el hexano, durante el proceso de extracción orgánica llevado a cabo. Así,

existen diversos compuestos terpénicos que han demostrado su capacidad antiinflamatoria, sesquiterpenos -generalmente lactonas-, sesterterpenos, diterpenos, triterpenos... [2,4,91,147,180,247,366,367,368,390,389; Apéndice II: Tesis 1,5,7,10].

A su vez, el metanol arrastra, en la extracción practicada, compuestos polares, como por ejemplo los flavonoides, por lo que puede decirse que si la especie *Teucrium buxifolium* posee compuestos flavónicos, tal y como indica la bibliografía y como ya ha podido comprobarse en el estudio fitoquímico realizado, su extracto metanólico debe ser rico en estos compuestos de naturaleza flavónica. Por tanto, puede conjeturarse que la actividad del extracto metanólico del *Teucrium buxifolium* sea debida a estas sustancias flavónicas, ya que se conocen varios representantes de este grupo químico de reconocida actividad antiinflamatoria [2,6,29,150,227,360,363].

La infusión de la especie, por su parte, podría deber su actividad antiinflamatoria a diversos compuestos, ya que la extracción en agua, a alta temperatura, arrastra productos de muy variada naturaleza. Así, el hecho de que los heterósidos sean solubles en agua puede explicar que la infusión presente, en ocasiones, mayor actividad que los extractos orgánicos, puesto que los azúcares, a veces, potencian la acción de la propia genina.

Existen dos grupos principales de fármacos antiinflamatorios, los corticosteroides y los no esteroídicos. En ambos casos, las acciones farmacológicas de estos compuestos, se acompañan de numerosos efectos secundarios.

Con respecto a los primeros, los efectos derivados de sus acciones glucocorticoides y mineralocorticoides limitan en gran medida su uso, restringiéndolo a casos muy concretos, a pesar de ser los antiinflamatorios de elección por su potente actividad reductora de los procesos flogísticos.

Los AINE, por su parte, presentan el grave inconveniente de producir, en mayor o menor medida, alteraciones gastrointestinales, de gravedad

variable, desde simples dispepsias hasta ulceraciones de mucosa con perforación y hemorragia. La erosión de la mucosa gastroduodenal deriva, por un lado del carácter ácido débil que exhibe la mayoría de los fármacos de este grupo, y por otro lado, del mecanismo de acción de estos compuestos, relacionado con la síntesis de PG. La inhibición de la enzima CO supone, a nivel gastroduodenal, una pérdida del equilibrio existente entre los llamados factores agresivos y protectores de la mucosa gástrica, quedando así expuesta a la acción del ácido luminal. Por ello, numerosos proyectos de investigación luchan por contrarrestar estas acciones gastroerosivas de los AINE, ya que constituyen los fármacos antiinflamatorios más recurridos, porque, a pesar de todo, la gravedad de sus efectos secundarios es menor que en el caso de los corticosteroides.

Es por esto, que la relevancia de la actividad antiinflamatoria de la especie *Teucrium buxifolium* se vería gravemente comprometida en el caso de verse acompañada de efectos lesivos a nivel gastrointestinal, ya que no supondría ningún avance en la actual terapéutica antiinflamatoria. Se estimó imprescindible, una vez confirmada su actividad antiinflamatoria, ampliar su estudio farmacológico a nivel de los efectos en mucosa gastroduodenal. Para ello se eligieron dos modelos experimentales de inducción de úlceras, que permitiesen valorar, por un lado la actividad antiulcerosa y por otro, la posible capacidad citoprotectora de la mucosa gastroduodenal.

Por un lado, diversas especies del género *Teucrium* se emplean en medicina popular como antiulcerosos [28,293] y por otro, la presencia en el género y especie de compuestos terpénicos y flavónicos, hace esperar que esta especie manifieste cierta acción beneficiosa frente a la inducción experimental de úlceras, ya que se ha comprobado la actividad gastroprotectora tanto de derivados terpénicos [262], como de compuestos flavónicos [2,6,249,358,360].

La inducción experimental de úlceras por indometacina, es debida por un lado a su carácter ácido y por otro a la inhibición de la síntesis de PG que ocasiona, como resultado de su mecanismo de acción antiinflamatoria. Las

PG constituyen uno de los factores de protección de la mucosa gástrica por presentar un efecto antisecretor del jugo gástrico, secreción de bicarbonato, vasodilatación, capacidad trófica y de secreción de *mucus*. La inhibición de su síntesis ocasiona un desequilibrio entre los mecanismos defensivos y protectores de la mucosa, y el carácter ácido débil de la indometacina ocasionaría la ulceración de la mucosa con mayor facilidad. A un pH superior al que normalmente existe en el estómago, la indometacina no puede actuar, por lo que si los productos en estudio poseen actividad antisecretora, este efecto protegerá frente al daño ocasionado por la indometacina.

En este modelo, se ha escogido como patrón de referencia la ranitidina, por ser un potente antisecretor de acción sobre los receptores histaminérgicos H_2 . Manifiesta una elevada actividad en los ensayos realizados, con porcentajes de actividad hasta del 99.72%, con lo que confirma plenamente su actividad antiulcerosa.

Se ha ensayado la actividad frente a las úlceras inducidas experimentalmente mediante la administración oral de indometacina, tanto de los dos extractos orgánicos de la especie *Teucrium buxifolium* que manifestaron actividad antiinflamatoria, como de la infusión de la misma, forma de uso popular de esta especie. El extracto hexánico de *Teucrium buxifolium* previene la formación de las lesiones ulcerosas por indometacina, con porcentajes de actividad cercanos al 90% y el extracto metanólico se comporta como potente antiulceroso, comparable al patrón, inhibiendo la ulceración en un 95%, con respecto al control. A su vez, la infusión de esta especie presenta una actividad similar a la del extracto hexánico, protegiendo frente a la ulceración inducida por la indometacina en un 89.54%.

La inducción experimental de úlceras por etanol, agente necrosante por contacto, sigue un mecanismo no dependiente de la secreción de ácido, por lo que permite evidenciar una acción citoprotectora de los productos en estudio. Como fármaco patrón se emplea la atropina, ya que a dosis en las

que no se comporta como antisecretor ejerce un papel citoprotector equiparable a la PGE_2 [307], manifestando en los ensayos realizados porcentajes de actividad del 60 al 76%. Tanto en las experiencias realizadas con los extractos orgánicos de *Teucrium buxifolium*, como en las que se ensayó la actividad de la infusión de la especie, el patrón fue superado por los productos en estudio, a pesar de ser éste un potente citoprotector de mucosa gástrica, por lo que se puede afirmar que el *Teucrium buxifolium* presenta una elevada capacidad citoprotectora de mucosa gástrica, frente a las lesiones necróticas por etanol.

El extracto hexánico de la especie objeto de estudio previene la formación de úlceras por administración oral de etanol absoluto en un 72.09%, mientras que el metanólico posee un elevado grado de citoprotección, del 90.70%, con respecto al lote control. La infusión protege frente al daño mucosal por el agente necrótico, con el máximo porcentaje de actividad de todos los tratamientos, 97.28%.

Los resultados obtenidos indican que los extractos hexánico y metanólico de la especie *Teucrium buxifolium*, así como el liofilizado de su infusión, impiden el desarrollo de la úlceras inducidas por indometacina, potente inhibidor de la síntesis de PG, con porcentajes de actividad próximos o superiores al 90%.

De igual forma, manifiestan un interesante grado de citoprotección de mucosa gástrica, al proteger frente a las lesiones necróticas provocadas por la acción directa del etanol sobre la mucosa gástrica. Probablemente ejercen un papel similar al del *mucus*, tapizando la superficie mucosal, quizá provocando una hidrofobicidad en el medio, por lo que se evita la acción directa sobre mucosa del ácido luminal o el agente necrosante, así como su penetración al interior de las células mucosas, por lo que se impiden sus acciones lesivas.

Se ha comprobado la acción gastroprotectora de algunos derivados terpénicos tipo fitoesteroles [262], compuestos que probablemente se

encuentren en el extracto hexánico de *Teucrium buxifolium*, justificando así su capacidad de proteger a la mucosa gástrica de las lesiones necróticas por etanol y la ulceración inducida por indometacina.

De igual forma el extracto metanólico con toda seguridad debe ser rico en compuestos flavónicos, grupo químico que ha demostrado en diversas ocasiones gozar de actividad antiulcerosa [2,6,249,358,360], por lo que esta actividad del extracto metanólico podría ser debida a derivados flavónicos.

Así mismo, como ya se ha indicado, la infusión podría deber su actividad frente a las úlceras inducidas experimentalmente, a la presencia, en la misma, de compuestos de muy diversa naturaleza.

Por tanto, del estudio farmacológico llevado a cabo sobre la especie *Teucrium buxifolium*, puede decirse que la notable actividad antiinflamatoria que manifiesta esta especie, supone un gran beneficio para las actuales perspectivas terapéuticas, al presentar al mismo tiempo una importante actividad antiulcerosa y citoprotectora de mucosa gastroduodenal.

Llegados a este punto, es preciso señalar que la confirmación a nivel científico de la actividad farmacológica de especies de uso popular, tiene como objeto final, no sólo justificar dicho empleo, sino la búsqueda de nuevos principios activos de origen natural que aporten ventajas con respecto a los fármacos existentes en la actualidad. Por ello, es preciso encontrar los principios responsables de la actividad farmacológica comprobada experimentalmente.

El extracto hexánico de *Teucrium buxifolium* fue elegido para proceder al aislamiento de sus principios activos, por presentar una notable actividad antiinflamatoria, así como antiulcerosa y citoprotectora. Los compuestos terpénicos, abundantes en el género y presentes con toda probabilidad en el extracto hexánico de la especie objeto de estudio, podrían ser los responsables de la inhibición del proceso inflamatorio que

el extracto de dicha naturaleza demuestra, de forma notable y constante, a lo largo de todo el proceso.

Se procedió al fraccionamiento del extracto hexánico de *Teucrium buxifolium*, mediante la aplicación de técnicas cromatográficas, con el objetivo de aislar los principios activos, posibles responsables de dichas acciones farmacológicas.

El fraccionamiento cromatográfico progresivo se ha llevado a cabo por medio de separaciones en columna, empleando lechos de Silicagel o Sephadex, mediante técnicas de Cromatografía Flash o MPLC. La elección de las fases móviles se realiza mediante ensayos en TLC, basados en las series eluotrópicas de Trappe (modificada por Wren) y Stahl [312] y optimización de fases móviles mediante el sistema PRISMA [221].

De forma paralela al proceso de fraccionamiento cromatográfico, se realiza el seguimiento de la actividad antiinflamatoria de las fracciones cromatográficamente más interesantes, elegidas tanto por el aspecto que presentan en TLC, como por su rendimiento.

El método elegido para estos ensayos fue el test del edema plantar en ratones [315,383], ya que presenta la ventaja de requerir cantidades de muestra de las fracciones a estudiar, claramente inferiores a las de otras pruebas farmacológicas. Se escogen las fracciones más activas para proceder a la siguiente purificación, y así sucesivamente.

El proceso de fraccionamiento se inició empleando Cromatografía Flash y separaciones en lecho de Sephadex, llegando a la obtención de dos fracciones de alta pureza: Fracción I.a y I.b, presentando esta última, cristalización espontánea.

A pesar de estos resultados, el extracto presentaba graves problemas de solubilidad en las fases móviles elegidas, por lo que los bajos rendimientos de las subfracciones obligaban a cambiar la estrategia de

fraccionamiento y optimizar el proceso, con el fin de conseguir mayor cantidad de los productos puros, para así realizar la determinación estructural. Para ello se ha recurrido al empleo de técnicas de MPLC y Cromatografía Flash, combinación que ha resultado obviamente ventajosa en el proceso de fraccionamiento de dicho extracto, ya que el uso de técnicas de MPLC ha solucionado el grave inconveniente que presentaba la precipitación del extracto hexánico de *Teucrium buxifolium*. En MPLC, la carga de la muestra se realiza mediante un inyector que trabaja con N_2 , admitiendo una muestra de mayor volumen que en las columnas de Cromatografía Flash. El extracto hexánico al estar disuelto en un volumen más elevado no presenta precipitación, por lo que se puede suponer que dicha precipitación podría haber sido debida a sobresaturación.

Mediante el protocolo II de fraccionamiento del extracto hexánico se obtienen tres fracciones de elevada pureza: Fracción II.a, II.b y II.c. Dichas fracciones inhiben satisfactoriamente el edema plantar agudo, con porcentajes de actividad próximos o superiores a los presentados por el fármaco patrón

A continuación, se procedió a la aplicación de las técnicas analíticas pertinentes, para la determinación estructural de los componentes de las fracciones obtenidas en los procesos de purificación cromatográfica: RMN, EM y CG/EM.

La Fracción II.a coincide en aspecto y comportamiento cromatográfico con la Fracción I.a, pero de ésta no se dispone de suficiente cantidad para su análisis estructural, asumiendo que probablemente se trate del mismo compuesto o al menos de isómeros. La Fracción II.a está constituida principalmente por el sesquiterpeno 8-hidroxi-4(15)-*trans*-eudesmeno, de peso molecular 222 y fórmula $C_{15}H_{26}O$. Esta fracción presenta además dos componentes, en proporción mucho menor, que deben corresponder a un eudesmano diinsaturado (PM 220) y un eudesmano dihidroxilado (PM 238).

Los sesquiterpenos han sido puestos de manifiesto en el género *Teucrium* formando parte de sus aceites esenciales [63,132,370,351,352], así como

han sido aislados sesquiterpenos del grupo de los guaianos [49], valencanos [290] y más recientemente derivados del eudesmano [100].

Por ello, cabía esperar la posibilidad de aislar algún compuesto de naturaleza sesquiterpénica, aunque, hasta hace muy poco, no se tenía conocimiento de la existencia en el género de derivados eudesmanólidos.

La bibliografía consultada aporta, con respecto a la farmacología de este tipo de compuestos derivados del eudesmano, datos de su actividad como antimicrobianos, antimaláricos [11], anticarcinogénicos [391], e incluso antiinflamatorios [390].

Las Fracciones I.b y II.b presentan en común su aspecto y desarrollo cromatográfico y cristalización espontánea en forma de cristales aciculares. Además, comparten un mismo espectro de ^1H -RMN, por lo que pueden ser consideradas como una sola fracción.

Dicho espectro de protón manifestaba gran complejidad, por lo que se sometió a la fracción a un proceso de acetilación que resultó infructuoso, puesto que no permitió la separación de las distintas estructuras que formaban parte de esta fracción.

Esta mezcla está formada por tres componentes mayoritarios que, en conjunto, representan más del 90% de la muestra, y han sido identificados como el 3β -hidroxi-22E-5,22-estigmastadieno o estigmasterol, un 3β -hidroxi-5-estigmastadieno y el 3β -hidroxi-5-estigmasteno o β -sitosterol. Estos principios pertenecen al grupo de los fitoesteros, con fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ y $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, PM 412 y 414, respectivamente.

Generalmente, en las plantas aparecen juntos más de un fitoesterol, siendo muy compleja la separación de los mismos, al presentar entre ellos diferencias estructurales mínimas, como es el caso de la Fracción II.b del extracto hexánico de *Teucrium buxifolium*.

En el screening fitoquímico practicado sobre la especie objeto de estudio, los ensayos cualitativos que ponen de manifiesto el esqueleto esteroide permitían prever la presencia en la especie de fitoesteroles, de igual forma que en otras especies del género [55,319,327]. Así, el β -sitosterol y el estigmasterol, presentes en la Fracción II.b, han sido descritos en diversas especies del género *Teucrium* [55,100], así como otros esteroides, como el clerosterol [55,319], campesterol y brassicasterol [327].

El β -sitosterol posee actividad gastroprotectora frente a ulceraciones inducidas experimentalmente, al mantener una superficie hidrófoba en la mucosa gástrica, impidiendo así el ataque por el ácido luminal [262], por lo que podría justificar, al menos en parte, la actividad antiulcerosa y citoprotectora que el extracto hexánico de *Teucrium buxifolium* manifiesta. Así, la especie *Teucrium polium* se emplea en medicina popular como antiulceroso [293], especie en la que también ha sido aislado el β -sitosterol [55], al que podría deber, en parte, sus efectos gastroprotectores.

Por otro lado, la actividad antiinflamatoria del β -sitosterol se encuentra recogida en trabajos de Yesilada y cols. [389], y el estigmasterol neutraliza el veneno de la serpiente de cascabel [213], veneno que debe su toxicidad a la enzima PLA_2 . Quizá esta última acción es compartida por otras especies del género, que son utilizadas contra las mordeduras de serpiente [351,353], como por ejemplo el *Teucrium polium*, especie en la que también se ha aislado el estigmasterol [55].

La PLA_2 del veneno de la serpiente de cascabel pertenece, según la clasificación establecida por Davison [76], al mismo grupo que la PLA_2 sinovial humana. La actividad de esta enzima es inhibida por los corticosteroides, compuestos que proceden del colesterol, tras sufrir diversas modificaciones químicas, como la ruptura de la cadena carbonada en C17. El estigmasterol presenta una gran similitud estructural con el colesterol y el doble enlace en 22 hace más lábil la cadena lateral. Por tanto, es posible que el mecanismo de la actividad antiinflamatoria de ambos

compuestos, β -sitosterol y estigmasterol, pueda estar relacionado con la inhibición de la PLA₂, enzima limitante de la síntesis de PG y LT, importantes mediadores de los procesos inflamatorios.

El análisis estructural de la Fracción II.c indica que se trata de un compuesto de fórmula molecular C₃₀H₅₀O, correspondiente a un triterpeno. La espectrometría de masas revela la presencia fundamentalmente de tres compuestos, proporcionando el componente principal un ion a $m/z=218$, que corresponde con la fragmentación esperada de los triterpenos tipo β -amirina, que al poseer una insaturación entre C12 y C13, dan lugar a una transposición del tipo McLafferty [79]. En conjunto, los datos aportados por las técnicas de elucidación estructural permiten deducir que la Fracción II.c es una mezcla de α y β -amirina, fundamentalmente.

En el género *Teucrium* se ha señalado la existencia de mezclas de α y β -amirina, por ejemplo en la especie *T. heterophyllum* [100]. Estos compuestos son los representantes principales de dos de los tres grupos en que están clasificadas las saponinas triterpénicas, ampliamente distribuidas en las Dicotiledóneas. En la especie *Teucrium buxifolium*, el screening fitoquímico ya indicaba la presencia de saponinas triterpénicas en la especie, al ser positivas las reacciones cualitativas de este grupo de compuestos.

La β -amirina y el acetato de α y β -amirina disminuyen la síntesis de 5-HETE, productos derivados de la 5-LO, hecho que podría explicar la actividad antiartrítica demostrada por estos principios [163], y por tanto justificar la actividad antiinflamatoria que presenta la Fracción II.c.

Los distintos principios identificados en la especie *Teucrium buxifolium*, han reducido activamente los procesos inflamatorios inducidos experimentalmente, por lo que son responsables, al menos en parte, de la actividad antiinflamatoria de la especie objeto de estudio, justificando plenamente su uso popular en el tratamiento de afecciones reumáticas y todo tipo de inflamaciones.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- El screening fitoquímico llevado a cabo sobre la especie *Teucrium buxifolium* pone de manifiesto la presencia de los siguientes grupos químicos: azúcares, ácidos fenólicos, flavonoides, saponinas, compuestos de naturaleza esteroídica y resinas. Así mismo, se puede afirmar la presencia, en la especie, de derivados terpénicos, en base a la revisión bibliográfica realizada.

2.- Los extractos hexánico y metanólico de la especie *Teucrium buxifolium* corroboran su actividad antiinflamatoria frente a la artritis generalizada inducida. Así mismo, la infusión de la especie, forma de uso popular, reduce activamente el proceso artrítico experimental.

Tanto los extractos hexánico y metanólico, como la infusión de *Teucrium buxifolium* inhiben de forma satisfactoria el edema plantar agudo por carragenina.

3.- Los extractos hexánico y metanólico y la infusión de la especie *Teucrium buxifolium* previenen la formación de úlceras inducidas por indometacina, con una elevada actividad. De igual forma, manifiestan un alto grado de citoprotección de mucosa gástrica, frente a las lesiones necróticas provocadas por etanol. Por tanto, la notable actividad antiinflamatoria de la especie *Teucrium buxifolium*, amplía el actual horizonte terapéutico al verse acompañada de una beneficiosa actividad antiulcerosa y citoprotectora.

4.- El extracto hexánico de *Teucrium buxifolium* fue sometido a un fraccionamiento progresivo mediante técnicas de Cromatografía Flash y MPLC, obteniendo diversas fracciones de elevada pureza. Se procedió al análisis estructural de las fracciones II.a, II.b y II.c.

5.- La aplicación de las técnicas analíticas pertinentes, ha permitido la elucidación estructural de los componentes de las fracciones obtenidas en los procesos de purificación cromatográfica:

La Fracción II.a está constituida principalmente por el sesquiterpeno 8-hidroxi-4(15)-*trans*-eudesmeno, acompañado de dos compuestos estructuralmente relacionados, en proporción mucho menor, que deben corresponder a un eudesmano diinsaturado y un eudesmano dihidroxilado.

La Fracción II.b está formada por 3 componentes, identificados como estigmasterol, β -sitosterol y un derivado 3 β -hidroxi-5-estigmastadieno.

La Fracción II.c es un mezcla de α y β -amirina, fundamentalmente.

6.- Estos principios químicos, identificados en la especie *Teucrium buxifolium*, ejercen una marcada inhibición del edema plantar inducido por carragenina, por lo que son responsables, al menos en parte, de la actividad antiinflamatoria de dicha especie, justificando plenamente su empleo en medicina tradicional, como paliativo de afecciones reumáticas y otros procesos que cursan con inflamación.

Queda por finalizar el estudio de la composición del extracto metanólico e infusión, de esta especie de uso popular en el levante español, que está resultando de una fitoquímica difícil y de una farmacología sumamente interesante.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.- "Antiinflammatory and antiulcerogenic activities of the organic extracts of *Tanacetum microphyllum* D.C. in rats". *Phytother. Res.* 5:179-181, 1991.
 - 2.- ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.- "Antiinflammatory activity of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum*". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 56(7):1164-1167, 1993.
 - 3.- AJABNOOR, M.A.; AL-YAHYA, M.A.; TARIQ, M.; JAYYAB, A.A.- "Antidiabetic activity of *Teucrium oliverianum*". *Fitoterapia* 55 (4):227-230, 1984.
 - 4.- ALCARAZ, M.J.; GARCIA-OCHOA, M.; JIMÉNEZ, M.J.; VALVERDE, S.; VILLAR, A.- "A derivative of *ent*-13-*epi*-manoyl oxide isolated from *Sideritis javalambrensis*". *Phytochemistry* 28:1267-1268, 1989.
 - 5.- ALCARAZ, M.J.; JIMÉNEZ, M.J.; VALVERDE, S.; SANZ, J.; RABANAL, R.M.; VILLAR, A.- "Antiinflammatory compounds from *Sideritis javalambrensis* n-hexane extract". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 52:1088-1091, 1989.
 - 6.- ALCARAZ, M.J.; TORDERA, M.- "Studies on the gastric anti-ulcer activity of hypolaetin-8-glucoside". *Phytother. Res.* 2(2):85, 1988.
 - 7.- ALCAZAR, R.; TORRE, M.C. de la; RODRIGUEZ, B.; BRUNO, M.; PIOZZI, P.; SAVONA, G.; ARNOLD, N.A.- "Neo-clerodane diterpenoids from three species of *Teucrium*". *Phytochemistry* 31(11):3957-3960, 1992.
 - 8.- ALVARELLOS, A.; LIPSKY, P.E.; JASIN, H.E.- "Prostaglandin E₂ modulation of rheumatoid factor synthesis". *Arthritis Rheum.* 31:1473, 1988.
 - 9.- ALVAREZ, P.; BENEDÍ, J.; COMA, I.; IGLESIAS, I.; REBUELTA, M.; VILLAR, A.- "Activité antiinflammatoire de divers extraits végétaux". *Plant. Méd. Phytother.* 24(2):92-97, 1990.
 - 10.- ALLISON, M.C.; HOWATSON, A.G.; TORRANCE, C.J.; LEE, F.D.; RUSSELL, R.I.- "Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs". *N. Engl. J. Med.* 327(11):749-754, 1992.
 - 11.- ANGERHOFER, C.K.; PEZZUTO, J.M.; KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D.; STICHER, O.- "Antimalarial activity of sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella kielthra*". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 55(12):1787-1789, 1992.
-

-
- 12.- AQEL, M.B.; GHARAIBEH, M.N.; SALHAB, A.S.- "The calcium antagonistic effect of the volatile oil of *Teucrium polium*". *Int. J. Crude. Drug Res.* 28(3):201-207, 1990.
- 13.- AREND, W.P.- "IL-1 antagonism in inflammatory arthritis." *Lancet* 341:155-156, 1993.
- 14.- ARINO, M.R.; CATALÁN, M.; AZANZA, J.R.; HONORATO, J.- " 'Otros' mecanismos de acción de los aines". *Dolor & Inflamación* 5:361-368, 1988.
- 15.- AUERNHEIMER, C.; CALLAGHAN, P.; ESCOBAR, J.; JIMENEZ, J.; LACOMBA, I.; LAGUNA, E.; LÓPEZ, J.; MATEACHE, P.; ORS, J.; PONS I FRIGOLS, A.- "Apéndice a la Guía de la Naturaleza de la Comunidad Valenciana, Parques y Parajes Naturales". Ed. Prensa Alicantina. Alicante. p. 29-40, 61-80, 1990.
- 16.- AUSTEN, K.F.- "The role of arachidonic acid metabolites in local and systemic inflammatory process". *Drugs* 33 (suppl. 1):10-17, 1987.
- 17.- AUTORE, G.; CAPASSO, F.; DE FUSCO, R.; FASULO, M.P.; LEMBO, M.; MASCOLO, N.; MENGHINI, A.- "Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* L.". *Pharmacol. Res. Commun.* 16(1):21-29, 1984.
- 18.- BAKHLE, Y.S.- "Synthesis and catabolism of cyclo-oxygenase products". *British Med. Bull.* 39(3):214-218, 1983.
- 19.- BALTAS, M.; BENBAKKAR, M.; GORRICHON, L.; ZEDDE, C.- "Plant growth regulators G-1, G-2, G-3. Synthesis, extraction and determination of leaf content in *Eucaplyptus grandis*". *J. Chromatogr.* 600(2):323-326, 1992.
- 20.- BARNES, P.J.; BELVISI, M.G.; ROGERS, D.F.- "Modulation of neurogenic inflammation: novel approaches to inflammatory disease". *TIPS* 11:185-189, 1990.
- 21.- BEEK, T.A. van; DE GROOT, Ae.- "Terpenoid antifeedants. Part I. An overview of terpenoid antifeedants of natural origin". *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* 105:513-527, 1986.
- 22.- BELCH, J.J.F.- "Eicosanoids and rheumatology: inflammatory and vascular aspects". *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 36:219-234, 1989.
-

-
- 23.- BELLAKH DAR, J.; TORRE, M.C. de la; RODRIGUEZ, B.; SAVONA, G.; BRUNO, M.; PIOZZI, F.- "Halleridone and related products from *Teucrium decipiens*". *Planta Med.* 54(3):267, 1988.
- 24.- BÉZANGER-BEAUQUESNE, L.- "Nouveautés en phytothérapie. Neuvième revue". *Plant. Méd. Phytothér.* 35(4):242-277, 1991.
- 25.- BÉZANGER-BEAUQUESNE, L.; PINKAS, M.; TORCK, M.- "*Les Plantes dans la Thérapeutique Moderne*". Ed. Maloine, Paris. p. 413, 1986.
- 26.- BHARGAVA, K.P.; GUPTA, M.B.; TANGRI, K.K.- "Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone". *European J. Pharmacol.* 22:191-195, 1973.
- 27.- BHATTACHARYA, S.K.; SEN, A.P.; DAS GUPTA, G.; SETH, K.; SETH, P.K.- "Central muscarinic receptor subtypes and carrageenin-induced paw oedema in rats". *Res. Exp. Med.* 191:65-76, 1991.
- 28.- BIANCHINI, F.; CORBETTA, F.- "*Health Plants of the World, Atlas of Medicinal Plants*". Ed. Newsweek Book Inc. New York. p. 18, 1979.
- 29.- BIDET, D.; GAIGNAULT, J.; GIRARD, P.; POTIER, P.- "Du jardin des hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: les flavonoïdes". *L'actualité Chimique* (Avril):89-97, 1987.
- 30.- BILLINGHAM, M.E.J.- "Cytokines as inflammatory mediators". *British Med. Bull.* 43(2):350-370, 1987.
- 31.- BLACKWELL, G.J.; FLOWER, R.J.- "Inhibition of phospholipase". *British Med. Bull.* 39:260-264, 1983.
- 32.- BLAKE, D.R.; ALLEN, R.E.; LUNEC, J.- "Free radicals in biological systems -a review orientated to inflammatory processes". *British Med. Bull.* 43(2):371-385, 1987.
- 33.- BONEVA, I.M.; MALAKOV, P.Y.; PAPANOV, G.-"12-epiteupolin II, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium lamiifolium*". *Phytochemistry* 27(1):295-297, 1988.
- 34.- BONNET, J.; LOISEAU, A.M.; ORVOEN, M.; BESSIN, P.- "Platelet activating factor (PAF-acether) involvement in acute inflammatory and pain process". *Agents Actions* 11:559-652, 1981.
-

-
- 35.- BRÄUER, R.; THOSS, K.; WALDMANN, G.- "Autoreactive T-helper cells in experimental arthritis". *Agents Actions* 32(1/2):103-105, 1991.
- 36.- BRAY, M.A.- "Leukotrienes in inflammation". *Agents Actions* 19:87-98, 1986.
- 37.- BRAY, M.A.; CUNNINGHAM, F.M.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; SMITH, M.J.H.- "Leukotriene B₄: a mediator of vascular permeability". *British J. Pharmacol.* 72:483-486, 1981.
- 38.- BRAY, M.A.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; SMITH, M.J.H.- "LTB₄: biosynthesis and biological activities". *Prostaglandins Res. Stud. Ser.* 1:253-257, 1981.
- 39.- BRODIE, D.A.; CHASE, B.J.- "Role of gastric acid in aspirin-induced gastric irritation in the rat". *Gastroenterology* 53(5):604-610, 1967.
- 40.- BRODIE, D.A.; COOK, P.G.; BAUER, B.J.; DAGLE, G.E.- "Indomethacin induced intestinal lesions in the rat". *Toxicol. App. Pharmacol.* 17:615-624, 1970.
- 41.- BRUNO, M.; ALCAZAR, R.; TORRE, M.C. de la; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; PERALES, A.; ARNOLD, N. A.- "Neo- and seco-neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium gracile* and *Teucrium fruticans*". *Phytochemistry* 31(10):3531-3534, 1992.
- 42.- BRUNO, M.; DOMÍNGUEZ, G.; LOURENÇO, A.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; TORRE, M.C. de la; ARNOLD, N.A.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium gracile*". *Phytochemistry* 30(11):3693-3697, 1991.
- 43.- BRUNO, M.; OMAR, A.A.; PERALES, A.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; TORRE, M.C. de la- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium oliverianum*". *Phytochemistry* 30(1):275-282, 1991.
- 44.- BRUNO, M.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; SERVETTAZ, O.- "Ent-clerodane diterpenoids from six further species of *Teucrium*". *Phytochemistry* 24(11):2597-2599, 1985.
- 45.- BRUNO, M.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; TORRE, M.C. de la; SERVETTAZ, O.- "Neo-clerodane diterpenes from *Teucrium* species". *Phytochemistry* 31(12):4366-4367, 1992.
- 46.- BRUNO, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.; TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium canadense*". *Phytochemistry* 28(12):3539-3541, 1989.
-

-
- 47.- BRUNO, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.; TORRE, M.C. de la; SERVETTAZ, O.- "2-deoxychamaedroxide, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium divaricatum*", *Phytochemistry* 26(10):2859-2861, 1987.
- 48.- BRUNO, M.; SAVONA, G.; PASCUAL, C.; RODRÍGUEZ, B.- "Teugin, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium fragile*", *Phytochemistry* 20(9):2259-2261, 1981.
- 49.- BRUNO, M.; TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.; OMAR, A.A.- "Guaiane sesquiterpenes from *Teucrium leucocladum*", *Phytochemistry* 34(1):245-247, 1993.
- 50.- BRUNO, M.; TORRE, M.C. de la; SAVONA, G.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.- "A rearranged abietane diterpenoid from the root of *Teucrium fruticans*", *Phytochemistry* 29(8):2710-2712, 1990.
- 51.- BURCH, R.M.; CONNOR, J.R.; TIFFANY, C.W.- "Kallikrein-kininogen-kinin system in chronic inflammation". *Agents Actions* 27(3/4):258-260, 1989.
- 52.- BURCH, R.M.; DEHAAS, C.- "A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342:189-193, 1990.
- 53.- CABO TORRES, J.; ARTIGAS, P.; PARDO, P.; PANADERO, M.; NOSTI, J.- "Normalización de algunos métodos de análisis de plantas medicinales". *Farmacognosia XVIII*:225-252, 1957.
- 54.- CAMPS, F.; COLL, J.; DARGALLO, O.; RIUS, J.; MIRAVITLES, C.- "Clerodane diterpenoids from *Teucrium* and *Ajuga* plants". *Phytochemistry* 26(5):1475-1479, 1987.
- 55.- CAPASSO, F.; CERRI, R.; MORRICA, P.; SENATORE, F.- "Chemical composition and antiinflammatory activity of an alcoholic extract of *Teucrium polium* L." *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 59(11):1639-43, 1983.
- 56.- CARMO-CARREIRAS, M.; NASCIMENTO, J.- "Flavones from *Teucrium algarbiense*". *Fitoterapia* 63(3):277-278, 1992.
- 57.- CARREIRAS, M.C.; RODRÍGUEZ, B.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.; TORRES, M.R.; PERALES, A.- "A chlorine-containing and two 17 β -neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *vincentinum*". *Phytochemistry* 28(5):1453-1461, 1989.
- 58.- CARREIRAS, M.C.; RODRÍGUEZ, B.; TORRE, M.C. de la; PERALES, A.; TORRES, M.R.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.- "Rearranged abietane diterpenoids from the root of *Teucrium polium* subsp. *vincentinum*". *Tetrahedron* 46(3):847-860, 1990.
-

-
- 59.- CASTOT, A.; LARREY, D.- "Acute hepatitis following administration of Germander - containing products: 26 Cases". *Gastroenterol. Clin. Biol.* 16(12):916-922, 1992.
- 60.- CASTRO-FARIA, H.C.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; HENRIQUES, M.G.O.; CORDEIRO, R.S.B.; VARGAFTOG, B.B.- "Pharmacological modulation of 2-methyl-carbamate-PAF induced rat paw oedema". *J. Pharm. Pharmacol.* 42:203-204, 1990.
- 61.- CHANG, J.; MUSSER, J.H.; MCGREGOR, H.- "Phospholipase A₂ : function and pharmacological regulation". *Biochem. Pharmacol.* 30(15):2429-2436, 1987.
- 62.- CHEN, Y.; LI, C.; SUN, H.- "The diterpenoid from *Teucrium viscidum*". *Yunnan Zhiwn Yanjiu* 12(1):110, 1990. C.A. 55914h.
- 63.- CHIALVA, F.; GABRI, G.; LIDDLE, P.A.P.; ULIAN F.- "Indagine sulla composizione dell'olio essenziale di *Hypericum perforatum* L. e di *Teucrium chamaedrys* L.". *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 63(6):286-288, 1981.
- 64.- COHEN, E.- "Contribution à l'étude des *Teucrium* marocains de la Section Polium". *Trav. Inst. Sci. Chérifien Sér. Bot.* 9, 1956.
- 65.- COLMEIRO, M.- "Enumeración y revisión de las plantas de la Península Hispano Lusitana e Islas Baleares." Vol.I. Madrid. 1885.
- 66.- CONNORS, K.A.- "Curso de Análisis Farmacéutico. Ensayo del Medicamento." Ed. Reverté, S.A. Barcelona. p. 385, 1981.
- 67.- CONTI, P.; REALE, M.; BARBACANE, R.C.; PANARA, M.R.; BOGRAZIO, M.- "Inhibition of leukotriene B₄ in neutrophils by lipoxins A₄ and B₄". *Agents Actions* 32:85-87, 1991.
- 68.- CONTI, P.; REALE, M.; TRISI, P.; BARBACANE, R.C.; PANARA, M.R.; BONGRAZIO, M.; PIATELLI, A.- "Lipoxins increase granuloma formation induced by potassium permanganate 'in vivo'". *Agents Actions* 29:50-51, 1990.
- 69.- COOKE, T.D.V.- "Antigen-Induced Arthritis, Polyarthritis and Tenosynovitis". en GREENWALD, R.A.; DIAMOND, H.S.- "Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases". Vol I. Ed. CRC Press. Florida. p. 53-55, 1988.
- 70.- CRESPO, M.B.; MATEO, G.; GUEMES, J.- "Sobre *Teucrium buxifolium* Schreber (*Lamiaceae*) y especies relacionadas". *Bol. Soc. Brot. Sér.* 2(63):121-131, 1990.
-

-
- 71.- CROFT, D.N.- "Clinical effects on the gut of ingestion of aspirin, phenylbutazone, indomethacin and para-acetamol". *J. Pharm. Pharmacol.* 18:354-363, 1966.
- 72.- CRONQUIST, A.- "*The Evolution and Classification of Flowering Plants*". (2ª ed.) Ed. NYBG (The New York Botanical Garden). New York. p. 503-517, 1988.
- 73.- CUELLAR-RODRIGUEZ, S.- "*Manual de la Farmacia*". (2ª ed.) Ed. Publicación del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid. p. 598, 1988.
- 74.- DALLENBACH-TOELKE, K.; NYIREDY, Sz.; MEIER, B.; STICHER, O.- "Optimization of overpressured layer chromatography of polar naturally occurring compounds by the PRISMA model". *J. Chromatogr.* 365:63-72, 1986.
- 75.- DAS, U.N.- "Interaction(s) between essential fatty acids, eicosanoids, cytokines, growth factors and free radicals: relevance to new therapeutic strategies in rheumatoid arthritis and other collagen vascular diseases". *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 44:201-210, 1991.
- 76.- DAVIDSON, F.F.; DENNIS, E.A.- "Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms". *J. Mol. Evol.* 31: 228-238, 1990.
- 77.- DE, A.K.; GHOSH, J.J.- "Comparative studies on the involvement of histamine and substance P in the inflammatory response of capsaicin in rat paw". *Phytother. Res.* 4(1):42-44, 1990.
- 78.- DEVESA, J.A.- "*Flora Vascular de Andalucía Occidental*". Tomo 2. Ed. Ketres. Barcelona, 1987.
- 79.- DEY, M.P.; HARBORNE, J.B.- "*Methods in plant biochemistry*". Vol. 7. "*Terpenoids*". Ed. Academic Press. London. p. 2-9, 263-287, 331-359, 369-434, 1991.
- 80.- DÍAZ, D.; FERROUDJI, S.; HERAN, B.; BARNEON, G.; LARREY, D.; MICHEL, H.- "Wild Germander-induced acute hepatitis [1]". *Gastroenterol. Clin. Biol.* 16(12):1006-1007, 1992.
- 81.- DINIZ-D'SOUZA, R.S.; DHUME, V.G.- "Gastric cytoprotection". *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 35(2):88-98, 1991.
-

-
- 82.- DOHERTY, N.S.; ROBINSON, B.V.- "The inflammatory response to carrageenan", *J. Pharm. Pharmac.* 27:701-703, 1975.
- 83.- DOMÍNGUEZ, A.X.- "*Métodos de Investigación Fitoquímica*". Ed. Limusa. México, 1973.
- 84.- DORSCH, W.; WAGNER, H.- "New antiasthmatic drugs from tradicional medicine?", *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 94(1-4):262-265, 1991.
- 85.- DRAY, A.; STUART, B.- "Inflammation and hyperaigesia: highligting the team effort". *TIPS*, 14(8):287-290, 1993.
- 86.- EGUREN, L.; PERALES, A.; FAYOS, J.; SAVONA, G.; PATERNOSTRO, M.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.- "New clerodane diterpenoid form *Teucrium polium* subsp. *aureum*. X-Ray structure determination". *J. Org. Chem.* 46:3364-3367, 1981.
- 87.- EGUREN, L.; PERALES, A.; FAYOS, J.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.- "New neo-clerodane diterpenoid containing an oxetane ring isolated from *Teucrium chamaedrys*. X-Ray structure determination". *J. Org. Chem.* 47(21):4157-4160, 1982.
- 88.- FAUGERAS, G.; LAVENIR, R.- "*Guide de Travaux Practiquees d'essai des Drogues*". Ed. Masson et Cie, París, 1965.
- 89.- FAYOS, J.; FERNÁNDEZ-GADEA, F.; PASCUAL, C.; PERALES, A.; PIOZZI, F.; RICO, M.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.- "Correct structures of montanin G, teupolin I, from the *Teucrium* species". *J. Org. Chem.* 49(10):1789-1793, 1984.
- 90.- FAYOS, J.; MARTÍNEZ-RIPOLL, M.; PATERNOSTRO, M.P.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.- "New clerodane diterpenoid from *Teucrium eriocephalum*". *J. Org. Chem.* 44(26):4992-4994, 1979.
- 91.- FENICAL, W.- "Marine soft corals of the genus *Pseudopterogorgia*: a resource for novel antiinflammatory diterpenoids". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 50(6):1001-1008, 1987.
- 92.- FEO, D.V.; AMBROSIO, C.; SENATORE, F.- "Traditional phytotherapy in Caserta province, Campania, Southern Italy". *Fitoterapia* 63(4):337-349, 1992.
- 93.- FERNÁNDEZ, P.; RODRÍGUEZ, B.; VILLEGAS, J.A.; PERALES, A.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.; BRUNO, M.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium pyrenaicum* and *Teucrium subspinosum*". *Phytochemistry* 25(6):1405-1409, 1986.
-

-
- 94.- FERNÁNDEZ-GADEA, F.; PASCUAL, C.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.- "6-epiteucvin A, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium chamaedrys*". *Phytochemistry* 22:723-725, 1983.
- 95.- FERNÁNDEZ-GADEA, F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.- "Isoeriocephalin and 20-deacetyleriocephalin, neoclerodane diterpenoids from *Teucrium lanigerum*". *Phytochemistry* 23(5):1113-1118, 1984.
- 96.- FERNÁNDEZ-GADEA, F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *capitatum*". *Phytochemistry* 25(1):181-184, 1986.
- 97.- FERREIRA, S.H.; MONCADA, S.; VANE, J.R.- "Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from spleen". *Nature New Biology* 231:237-239, 1971.
- 98.- FONT QUER, P.- "*Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado*". Ed. Labor, p. 644-651, 1962.
- 99.- FOURNIER, P.- "*Plantes médicinales et vénéneuses de France*". Tome III. Paris, 1948.
- 100.- FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; MESTRES, T.; ARTEAGA, J.M.; PERALES, A.- "Eudesmane sesquiterpenes from *Teucrium heterophyllum*. The X-Ray structure of teucdiol A". *Phytochemistry* 34(4):1083-1086, 1993.
- 101.- FRIEDMAN, J.; YANIV, Z.; DAFNI, A.; PALEWITCH, D.- "A preliminary classification of the healing potential of medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field survey among Bedouins in the Negev desert, Israel". *J. Ethnopharmacol.* 16(2-3):275-287, 1986.
- 102.- FRIEDMAN, G.D.; SIEGELAUBN, A.B.; SELTZER, C.C.- "Cigarettes, alcohol, coffee and peptic ulcer". *N. Engl. J. Med.* 290:469-473, 1974.
- 103.- FUJITA, E.; NAGAO, Y.; NODE, M.- "Diterpenoids of *Isodon* and *Teucrium* plants". *Heterocycles* 5:793-838, 1976.
- 104.- GACS-BAITZ, E.; KAJTAR, M.; PAPANOV, G.Y.; MALAKOV, P.Y.- "Carbon-¹³ NMR spectra of some furanoid diterpenes from *Teucrium* species". *Heterocycles* 19(3):539-550, 1982.
- 105.- GACS-BAITZ, E.; PAPANOV, G.Y.; MALAKOV, P.Y.; SZILAGYI, L.- "C-12-stereochemistry of teupolin I and related diterpenoids from *Teucrium* species". *Phytochemistry* 26(7):2110-2112, 1987.
-

-
- 106.- GACS-BAITZ, E.; RADICS, L.; OGANESSIAN, G.B.; MNATSAKIAN, V.A.- "Teucrins H₁ - H₄, novel clerodane type diterpenes from *Teucrium hyrcanicum*". *Phytochemistry* 17:1967-1973, 1978.
- 107.- GALLIN, J.I.- "Inflammation," en WILLIAM, E.- "Fundamental Immunology," (2^a ed.) Ed. Raven Press Ltd. New York. p. 721-733, 1988.
- 108.- GARCÍA-ÁLVAREZ, M.C.; MARCO, J.L.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium pyrenaicum*". *Phytochemistry* 21(10):2559-2562, 1982.
- 109.- GHARAIBEH, M.N.; ELAYAN, H.H.; SALHAB, A.S.- "Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*". *J. Ethnopharmacol.* 24(1):93-99, 1988.
- 110.- GHARAIBEH, M.N.; ELAYAN, H.H.; SALHAB, S.- "Anorexic effect of *Teucrium polium* in rats". *Int. J. Crude. Drug Res.* 27(4):201-210, 1989.
- 111.- GILG, E.; SCHÜRHOFF, N.- "Botánica Aplicada a la Farmacia". (2^a ed.) Ed. Labor, Barcelona. p. 150-154, 244-247, 256-260, 366, 382, 387-388, 1934.
- 112.- GILG, E.; BRANDT, G.- "Farmacognosia. Materia Farmacéutica Vegetal y Animal". Ed. Labor. Barcelona. p. 405, 448, 1926.
- 113.- GIOVANNI, L. de; FREGNAN, G.B.; RABITTI, C.; MURARI, G.; AMATO, A.; SOVERO, A.- "Lack of gastric adverse effects of erdosteine in rats and men". *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 29(7):269-273, 1991.
- 114.- GOLSE, J.- "Matiere Medicale". Ed. Doin et Cie. Paris. p. 147, 567-568 1955.
- 115.- GÓMEZ-SERRANILLOS, M.- "Valoración de taninos en drogas por la antipirina". *Farmacognosia* IV:267, 1945.
- 116.- GONZÁLEZ, J.; BASABE, P.; SEXMERO, M.J.; SÁNCHEZ, I.- "Diterpenes from the latex of *Euphorbia broteri*". *Phytochemistry* 27(1):207-212, 1988.
- 117.- GONZÁLEZ, A.G.; JIMÉNEZ, I.A.; RAVELO, A.G.; SAZATORNIL, J.G.; BAZZOCHI, I.L.- "New sesquiterpenes with antifeedant activity from *Maytenus canariensis* (Celastraceae)". *Tetrahedron* 49(3):697-702, 1993.
-

-
- 118.- GOODWIN J.S.- "Are prostaglandins proinflammatory, antiinflammatory, both or neither?". *J. Rheumatol.* 18(suppl.28):26-29, 1991.
- 119.- GREEN, Y.; GREEN, D.; MURRAY, P.; WILSON, A.B.- "Factors influencing the inhibitory action of antiinflammatory drugs on carragenin induced oedema". *Brit. J. Pharmacol.* 41:132-139, 1971.
- 120.- GROSS, G.A.; LAHLOUB, M.F.; ANKLIN, C.; SCHULTEN, H.R.; STICHER, O.- "Teucrioside, a phenylpropanoid glycoside from *Teucrium chamaedrys*". *Phytochemistry* 27(5):1459-1463, 1988.
- 121.- GUTIERREZ, A.B.; HERZ, W.- "Guaianolides and other constituents of *Helianthus microcephalus*". *Phytochemistry* 27(7):2225-2228, 1988.
- 122.- HALL, I.H.; STARNES, C.O.; LEE, K.H.; WADDELL, T.G.- "Mode of action of sesquiterpene lactones as antiinflammatory agents". *J. Pharm. Sci.* 69:537-543, 1980.
- 123.- HALLIWELL, B.- "Drug antioxidant effects. A basis for drug selection?" *Drugs* 42(4):569-605, 1991.
- 124.- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.- "*Free Radicals, Ageing and Disease*". Cap. 8. en HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.- "*Free Radicals in Biology and Medicine*". (2A ed.) Ed. Clarendon Press, Oxford. p. 422-438, 1989.
- 125.- HALLIWELL, B.; HOULT, J.R.; BLAKE, D.R.- "Oxidants, inflammation, and antiinflammatory drugs". *FASEB J.* 2:2867-2873, 1988.
- 126.- HANSON, J.R.; RIVETT, D.E.A.; LEY, S.V.; WILLIAMS, D.J.- "The X-Ray structure and absolute configuration of insect antifeedant clerodane diterpenoids from *Teucrium africanum*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*:1005-1008, 1982.
- 127.- HARBORNE, J.B.- "*Phytochemical Methods*". Ed. Chapman and Hall. London. p. 1-32, 89-131 1973.
- 128.- HARBORNE, J.B.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; WILLIAMS, C.A.; GIL, M.I.- "A chemotaxonomic study of flavonoids from european *Teucrium* species". *Phytochemistry* 25(12):2811-2816, 1986.
-

-
- 129.- HARMALA, P.; VUORELA, H.; LEHTONEN, P.; HILTUNEN, R.- "Optimization of the high-performance liquid chromatography of coumarins in *Angelica archangelica* with reference to molecular structure", *J. Chromatogr.* 507:367-380, 1990.
- 130.- HARMALA, P.; VUORELA, H.; RAHKO, E.L.; HILTUNEN, R.- "Retention behaviour of closely related coumarins in thin-layer chromatographic preassays for high-performance liquid chromatography according to the PRISMA model", *J. Chromatogr.* 593(1-2):329-337, 1992.
- 131.- HARTWELL, J.L.- "Plants used against cancer. A survey". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 32(3):247-296, 1969.
- 132.- HASSAN, M.M.A.; MUHTADI, F.J.; AL-BADR, A.A.- "GLC-Mass spectrometry of *Teucrium polium* oil". *J. Pharm. Sci.* 68(6):800-801, 1979.
- 133.- HAWKEY, C.J.; MAHIDA, Y.R.; HAWTHORNE, A.B.- "Therapeutic interventions in gastrointestinal disease based on an understanding of inflammatory mediators", *Agents Actions* (Special Conference Issue):C22-C26, 1992.
- 134.- HELLEMONT, J. van- "*Compendium de Phytotherapie*". Ed. Service Scientifique. Bruxelles. p. 392-394, 1986.
- 135.- HENDERSON, B.; PETTIPHER, E.R.; HIGGS, G.A.- "Mediators of rheumatoid arthritis". *British Med. Bull.* 43(2):415-428, 1987.
- 136.- HERRERA, A.L.- "*Farmacopea Latino-Americana*". Ed. Talleres Gráficos Herrera Hnos. Suc. México. p. 300-301, 1921.
- 137.- HERTZ, F.; CLOAREC, A.- "Pharmacology of free radicals; recent views on their relation to inflammatory mechanisms". *Life Sci.* 34(8):713-720, 1984.
- 138.- HERZ, W.; GRISEBACH, H.; KIRBY G.W.- "*Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*", Vol. 36. Ed. Springer-Verlag. Wien. p. 33, 1979.
- 139.- HIGGS, G.A.; VANE, J.R.- "Inhibition of cyclo-oxygenase and lipoxigenase". *British Med. Bull.* 39(3):265-270, 1983.
- 140.- HIGGS, G.A.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R.- "A new approach to antiinflammatory drugs". *Biochem. Pharmacol.* 28:1959-1961, 1979.
-

-
- 141.- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A.- "*Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Product Isolation*". Ed. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-3, 27-55, 129-130, 1986.
- 142.- HUESO-RODRÍGUEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GADEA, F.; PASCUAL, C.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; PIOZZI, P.- "*Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium lanigerum**". *Phytochemistry* 25(1):175-180, 1986.
- 143.- HUMBERT, P.- "*Etiopatogenia de la Úlcera Péptica Gastroduodenal*", Cap. 19 en RODÉS, J.; PIQUÉ, J.M.- "*Patología de la Secreción Gástrica, Úlcera Péptica Gastroduodenal*". Ed. Doyma, Barcelona, p. 139-162, 1991.
- 144.- HUXTABLE, R.J.- "The myth of beneficent nature: the risks of herbal preparations". *Ann. Intern. Med.* 117(2):165-166, 1992.
- 145.- IKAN, R.- "*Natural Products*". Ed. Israel Universities Press, Jerusalem, p. 137-177, 1969.
- 146.- IVORRA, M.D.; PAYA, M.; VILLAR, A.- "A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs". *J. Ethnopharmacol.* 27:243-275, 1989.
- 147.- JACOBSON, P.B.; MARSHALL, L.A.; SUNG, A.; JACOBS, R.S.- "Inactivation of human synovial fluid phospholipase A₂ by the marine natural product, manoalide". *Biochem. Pharmacol.* 39(10): 1557-1564, 1990.
- 148.- JADIN, F.- "*Du Siège des Principes Médicamenteux dans les Végétaux*". Ed. Librairie des Sciences Naturelles, Paris, p. 60-76, 83-109, 140-142, 1984.
- 149.- JANKOWSKI, J.; BRIDGES, A.B.; SCOTT, N.; WORMSLEY, K.G.; BELCH, J.J.F.- "Circulating free-radical markers and peptic ulcer disease". *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 3(11):823-838, 1991.
- 150.- JIMÉNEZ, M.J.; ALCARAZ, M.J.; FERRANDIZ, M.L.- "Antiinflammatory activity of a flavone from *Sideritis leucantha*". *Planta Med.* 52:541, 1986.
- 151.- JOHNSON, H.D.- "Gastric ulcer: classification, blood groups, characteristics, secretion patterns and pathogenesis". *Ann. Surg.* 162:996-1004, 1965.
- 152.- KALOGJERA, Z.; BLAZEVIĆ, N.; STANIĆ, Z.- "Flavone glycosides of *Teucrium arduini*". *Planta Med.* 58(suppl.1):A690, 1992.
-

-
- 153.- KASSIS, S.; LEE, J.C.; HANNA, N.- "Effects of prostaglandins and cAMP levels on monocyte IL-1 production", *Agents Actions* 27(3/4):274-276, 1989.
- 154.- KAWASHIMA, T.- "Diterpenic lactones of *Mallotus repandus*", *Heterocycles* 5:227-232, 1976.
- 155.- KERWAR, S.S.; RIDGE, S.; ORONSKY, A.L.- "Comparative Studies between Adjuvant, type II Collagen, and Streptococcal Cell Wall-Induced Arthritis in Rats". en GREENWALD, R.A.; DIAMOND, H.S.- "Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases", Vol I. Ed. CRC Press, Florida. p. 49-52, 1988.
- 156.- KITCHEN, E.A.; DAWSON, W.; RAINSFORD, K.D.; CAWSTON, T.- "Inflammation and Possible Modes of Action of Antiinflammatory Drugs". en RAINSFORD, K.D.- "Antiinflammatory and Anti-Rheumatic Drugs". Vol. I. Ed. CRC Press, Florida. p. 21-87, 1985.
- 157.- KLARESKOG, L.- "What can we learn about rheumatoid arthritis from animal models?", *Springer Semin. Immunopathol.* 11:315-333, 1989.
- 158.- KLEBANOFF, S.J.- "Phagocytic Cells: Products of Oxygen Metabolism". Cap. 23 en GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, M.I.; SNYDERMAN, R.- "Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates". Ed. Raven Press, New York. p. 391-430, 1988.
- 159.- KUBO, I.; LEE, Y.W.; BALOGH-NAIR, V.; NAKANISHI, K.; CHAPYA, A.- "Structure of ajugarins". *J. Chem. Soc. (JCS) Chem. Comm.* 949-950, 1976.
- 160.- KULKARNI, S.K.; PARALE, M.P.- "Leukotrienes: biosynthesis, pharmacology and clinical significance". *Drugs of Today* 21(7):329-338, 1985.
- 161.- KUROSE, I.; SUEMATSU, M.; MIURA, S.; SUZUKI, M.; NAGATA, H.; MORISHITA, T.; SEKIZUKA, E.; TSUCHIYA, M.- "Involvement of superoxide anion and platelet-activating factor in increased tissue-type plasminogen activator during rat gastric microvascular damage". *Surg. Res. Commun.* 10(4):213-220, 1991.
- 162.- KVIETYS, P.R.; TWOHIG, B.; DANZELL, J.; SPECIAN, R.D.- "Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals". *Gastroenterology* 98:909-920, 1990.
- 163.- KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.A.- "Antilipoxygenase activity of amyrin triterpenes". *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 78(3):367-372, 1992.
-

- 164.- LABBE, C.; POLANCO, M.I.; CASTILLO, M.- "12-epi-teuscordonin and other neoclerodanes from *Teucrium bicolor*". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 52(4):871-874, 1989.
- 165.- LAGUNA, M.; AVILA, P.- "*Flora Forestal Española*". Tomo II. Ed. Imprenta del Colegio Nacional de Sordo-Mudos y de Ciegos, 1883.
- 166.- LAZARO E IBIZA, B.- "*Compendio de la Flora Española*". Tomo II. Ed. Librería de Hernando y Cía. Madrid, 1896.
- 167.- LECLERC, H.- "*Précis de phytothérapie: Essais de thérapeutique par les plantes Françaises*". Ed. Masson. Paris, 1983.
- 168.- LEWIS, R.A.; AUSTEN, F.- "*Leukotrienes*". Cap. 8 en GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, M.I.; SNYDERMAN, R.- "*Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*". Ed. Raven Press. New York. p. 121-128, 1988.
- 169.- LEWIS, W.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.- "*Medical Botany. Plants Affecting Mans Health*". Ed. Wiley-Interscience. New York. p. 390, 1977.
- 170.- LAMAISSON, J.L.; PETTITJEAN-FREYTET, C.; DUBAND, F.; CARNAT, A.P.- "Rosmarinic acid content and antioxidant activity in french *Lamiaceae*". *Fitoterapia* 62(2):166-171, 1991.
- 171.- LANDS, W.E.M.- "Biosynthesis of prostaglandins". *Annu. Rev. Nutr.* 11:41-60, 1991.
- 172.- LARREY, D.- "Herbal medicine hepatotoxicity". *Gastroenterol. Clin. Biol.* 16(12):913-915, 1992.
- 173.- LARREY, D.; VIAL, T.; PAUWELS, A.; CASTOT, A.; BICOUR, M.; DAVID, M.; MICHEL, H.- "Hepatitis after germander (*Teucrium chamaedrys* L.) administration: another instance of herbal medicine hepatotoxicity". *Ann. Intern. Med.* 117(2):129-132, 1992.
- 174.- LARSEN, G.L.; HENSON, P.M.- "Mediators of inflammation". *Ann. Rev. Immunol.* 1:335-359, 1983.
- 175.- LEE, Y.H.; MOLLISON, K.W.; CHENG, W.D.- "The effects of antiulcer agents on indomethacin induced gastric ulceration in the rat". *Arch. Int. Pharmacodyn.* 191:370-377, 1971.
-

-
- 176.- LEE, S.H.; SOYOOLA, E.; CHANMUGAM, P.; HART, S.; SUN, W.; ZHONG, H.; LIOU, S.; SIMMONS, D.; HWANG, D.- "Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide". *J. Biol. Chem.* 267(36):25934-25938, 1992.
- 177.- LEWIS, G.P.- "Immunoregulatory activity of metabolites of arachidonic acid and their role in inflammation". *British Med. Bull.* 39(3):243-248, 1983.
- 178.- LI, Y.; CHEN, Y.- "Diterpenoids from *Rabdosia pseudo-irrorata*". *Phytochemistry* 30(1):283-285, 1991.
- 179.- LIPSKY, P.E.; DAVIS, L.S.; CUSH, J.I.; OPPENHEIMER-MARKS, N.- "The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis". *Springer Semin. Immunopathol.* 11:123-162, 1989.
- 180.- LOOK, S.A.; FENICAL, W.; JACOBS, R.S.; CLARDY, J.- "The pseudoterpenes: antiinflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudoterogorgia elisabethae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:6238-6240, 1986.
- 181.- LOURENÇO, A.; TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.; BRUNO, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.- "The absolute stereochemistry of some clerodane diterpenoids isolated from *Teucrium* species". *Phytochemistry* 30(2):613-617, 1991.
- 182.- LOURENÇO, A.; TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.; HARADA, N.; ONO, H.; UDA, H.; BRUNO, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.- "The absolute stereochemistry at C-12- in 12-hydroxylated neo-clerodane diterpenoids". *Tetrahedron* 48(19):3925-3934, 1992.
- 183.- MALAKOV, P.Y.; BONEVA, I.M.; PAPANOV, G.Y.; SPASSOV, S.L.- "Teulamifin B, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium lamiifolium* and *T. polium*". *Phytochemistry* 27(4):1141-1143, 1988.
- 184.- MALAKOV, P.Y.; PAPANOV, G.Y.- "Furanoid diterpenes from *Teucrium polium*". *Phytochemistry* 22(12):2791-2793, 1983.
- 185.- MALAKOV, P.Y.; PAPANOV, G.Y.- "Teuchamaedrin C, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium chamaedrys*". *Phytochemistry* 24(2):301-303, 1985.
- 186.- MALAKOV, P.Y.; PAPANOV, G.Y.; BONEVA, I.M.; TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.- "Teulamioside, a neo-clerodane glucoside from *Teucrium lamiifolium*". *Phytochemistry* 34(4):1095-1098, 1993.
-

-
- 187.- MALAKOV, P.Y.; PAPANOV, G.Y.; BONEVA, I.M.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium montanum*". *Phytochemistry* 31(11):4029-4030, 1992.
- 188.- MALAKOV, P.Y.; PAPANOV, G.Y.; MOLLOV, N.M.- "Furanoid diterpenes in the bitter fraction of *Teucrium polium* L." *Z. Naturforsch.* 34b:1570-1572, 1979.
- 189.- MALAKOV, P.Y.; PAPANOV, G.Y.; MOLLOV, N.M.; SPASSOV, S.L.- "Montanin D, a new furanoid diterpene of clerodane type from *Teucrium montanum* L.", *Z. Naturforsch.* 33b:1142-1144, 1978.
- 190.- MALAKOV, P.Y.; PAPANOV, G.Y.; ZIESCHE, J.- "Teupolin III, a furanoid from *Teucrium polium*", *Phytochemistry* 21(10):2597-2598, 1982.
- 191.- MALAKOV, P.Y.; TORRE, M.C.de la; RODRÍGUEZ, B.; PAPANOV, G.Y.- "Some transformations of the neo-clerodane diterpene teubotrin". *Tetrahedron* 47(48):10129-10136, 1991.
- 192.- MALAMAS, M.; MARSELO, M.- "The tradition of medicinal plants in Zagori, Epirus (northwestern Greece)". *J. Ethnopharmacol.* 37(3):197-203, 1992.
- 193.- MARCO, J.L.; RODRÍGUEZ, B.; PASCUAL, C.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.- "Teuscorodin, teuscorodonin and 2-hydroxyteuscorolide, neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium scorodonia*". *Phytochemistry* 22(3):727-731, 1983.
- 194.- MARCO, J.L.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.- "Diterpenoids from *Teucrium scorodonia*, three neo-clerodane derivatives". *Phytochemistry* 21(10):2567-2569, 1982.
- 195.- MARCUS, A.J.- "Eicosanoids: Transcellular Metabolism". Cap. 9 en GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, M.I.; SNYDERMAN, R.- "Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates". Ed. Raven Press. New York. 129-137, 1988.
- 196.- MARHUENDA, E.; MARTÍN, M.J.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; JIMÉNEZ, B.- "Détermination de l'activité antiulcéreuse de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Actas Proceedings of the 1st International Congress of Plantes et Substances Naturelles d'interet thérapeutique* P25. Monastir Tunisie, en MARTÍN, M.J.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MARHUENDA, E.; DELGADO, F.- "Anti-ulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter in rats". *Phytother. Res.* 2(4):183-186, 1988.
- 197.- MARQUEZ, C.; RABANAL, R.M.; VALVERDE, S.; EGUREN, L.; PERALES, A.; FAYOS, J.- "Diterpenes from *Teucrium capitatum* L. X-Ray crystal and molecular structure of capitatin". *Tetrahedron Lett.* 21(52):5039-5042, 1980.
-

-
- 198.- MARQUEZ, C.; VALVERDE, S.- "A new clerodane diterpene from *Teucrium polium* L.". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*:2526-2527, 1979.
- 199.- MARQUEZ, C.; RABANAL, R.M.; VALVERDE, S.; EGUREN, L.; PERALES, A.; FAYOS, J.- "Diterpenes from *Teucrium capitatum* L. X-Ray crystal and molecular structure of lolin". *Tetrahedron Lett.* 22(29):2823-2826, 1981.
- 200.- MARTÍNEZ-RIPOLL, M.; FAYOS, J.; RODRÍGUEZ, B.; GARCÍA-ÁLVAREZ, M.C.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.; PATERNOSTRO, M.; HANSON, J.R.- "The absolute stereochemistry of some clerodane diterpenoids from *Teucrium* species". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*:1186-1190, 1981.
- 201.- MCCARTHY, D.M.- "Pathogenic mechanisms of gastroduodenal injury: nonsteroidal anti-inflammatory drugs". *Curr. Opin. Gastroenterol.* 7/6:876-880, 1991.
- 202.- McMILLAN, R.M.; FOSTER, S.J.- "Leukotriene B₄ and inflammatory disease". *Agents Actions* 24(1/2):114-119, 1988.
- 203.- MERRIT, A.T.; LEY, S.V.- "Clerodane diterpenoids". *Natural Product Reports* 9:243-287, 1992.
- 204.- MIKES, O.- "Fundamental types of Chromatography." en MIKES, O.; CHALMERS, R.A.- "Laboratory Handbook of Chromatographic Methods". Ed. D. Van Nostrand Company LTD. London. p. 13-31, 1966.
- 205.- MIN, Z.; XIE, N.; ZHANG, P.; ZHAO, S.; WANG, C.; ZHENG, Q.- "A neo-clerodane diterpene from *Teucrium japonicum*". *Phytochemistry* 30(12):4175-4177, 1991.
- 206.- MIN, Z.; XIE, N.; ZHAO, S.; WANG, C.; ZHENG, Q.- "Teuponin: a neo-clerodane diterpene from *Teucrium japonicum*". *Chin. Chem. Lett.* 2(5):371-372, 1991. C.A. 155054n.
- 207.- MIURA, S.; SUEMATSU, M.; TANAKA, S.; NAGATA, H.; HOUZAWA, S.; SUZUKI, M.; KUROSE, I.; SERIZAWA, H.; TSUCHIYA, M.- "Microcirculatory disturbance in indomethacin-induced intestinal ulcer". *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 261(2):213-219, 1991.
- 208.- MIYASE, T.; KAWASAKI, H.; NORO, T.; VENO, A.; FUKUSHIMA, S.; TEKEMOTO, T.- "Studies on the furanoid diterpenes from *Teucrium japonicum* Houtt.". *Chem. Pharm. Bull.* 29(12):3561-3564, 1981.
-

-
- 209.- MIZUSHIMA, Y.; TSUKADA, W.; AKIMOTO, T.- "A modification of rat adjuvant arthritis for testing antirheumatic drugs". *J. Pharm. Pharmac.* 24:781-785, 1972.
- 210.- MOHRLAND, J.S.; JOHNSON, E.E.- "Use of the adjuvant-induced arthritic rat model to evaluate non-steroidal anti-inflammatory analgesics". *J. Pharm. Pharmacol.* 35:401, 1983.
- 211.- MONCADA, S.; FERREIRA, S.H.; VANE, J.R.- "Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation". *Nature* 246:217-219, 1973.
- 212.- MONÉS I XIOL, J.- "Métodos Exploratorios: Secreción Ácida, Gastrina, y Pruebas de estimulación de Gastrina". Cap. 55 en VILARDELL, F.; PAJARES, J.M.; PÉREZ-MOTA, A.; MORENO GONZALEZ, E.- "Enfermedades Digestivas". Tomo I. "Generalidades, Esófago, Estómago y Duodeno". Ed. Cea. Madrid. 689-696, 1990.
- 213.- MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; SILVA, M.M. da; MELO P.A.; SUAREZ-KURTZ, G.- "Neutralization of letal and myotoxic activities of south american rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae)". *Toxicon*. 27(9):1003-1009, 1989.
- 214.- MOULISCH, G.; FOURASTE, I.; BON, M.- "Levatin, an 18-norclerodane diterpene from *Croton levatii*". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 55(4):445-449, 1992.
- 215.- NAGAO, Y.; ITO, N.; KOHNO, T.; KURODA, H.; FUJITA, E.- "Antitumor activity of *Rabdosia* and *Teucrium* diterpenoids against P388 lymphocytic leukemia in mice". *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 30(2):727-729, 1982.
- 216.- NAVARRO, T.; ROSÍA, J.L.- "Nomenclatural and taxonomic notes on the *Teucrium* section *Polium* (Miller) Schreber (*Lamiaceae*) in the Iberian peninsula". *Candollea* 45(2):581-589, 1990.
- 217.- NEWBOULD, B.B.- "Chemoterapy of arthritis induced in rats by micobacterial adjuvant". *Brit. J. Pharmacol.* 21:127-136, 1963.
- 218.- NORDMANN, R.; RIBIÈRE, C.; ROUACH, H.- "Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury". *Free Rad. Biol. Med.* 12:219-240, 1992.
- 219.- NYIREDY, Sz.; DALLENBACH-TOELKE, K.; ZOOG, G.C.; STICHER, O.- "Strategies of mobile phase transfer from thin-layer to medium pressure liquid chromatography with silica as stationary phase". *J. Chromatogr.* 499:453-462, 1990.
-

-
- 220.- NYIREDY, Sz.; ERDELMEIER, C.A.J.; MEIER, B.; STICHER, O.- "The 'PRISMA' mobile phase optimization model in thin-layer chromatography separation of natural compounds". *Planta Med.* 51:241-246, 1985.
- 221.- NYIREDY, Sz.; MEIER, B.; ERDELMEIER, C.A.J.; STICHER, O.- "PRISMA: A geometrical design for solvent optimization". *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.* 8:186-188, 1985.
- 222.- NYIREDY, Sz.; WOSNIOK, W.; THIELE, H.; STICHER, O.- "PRISMA model for computer-aided HPLC mobile phase optimization based on an automatic peak identification approach". *J. Liq. Chromatogr.* 14(16-17):3077-3110, 1991.
- 223.- OI, M.; OSHIDA, K.; SUGIMURA, S.- "The location of gastric ulcer". *Gastroenterology* 36:45-56, 1959.
- 224.- OSTENSEN, H.; GUDMONSEN, T.E.; OSTENSEN, M.- "Smoking, alcohol, coffee and familial factors: any associations with peptic ulcer disease? A clinically and radiologically prospective study". *Scand. J. Gastroenterol.* 20:1277-1335, 1985.
- 225.- OUTINEN, K.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.- "The retention behaviour of biogenic amines in the PRISMA model using reversed phase HPLC". *Acta Pharm. Fenn.* 101(1):11-20, 1992.
- 226.- PAHLAVANI, M.A.- "Immunomodulatory agents in the treatment of rheumatic diseases". *Drugs of Today* 26(3):169-178, 1990.
- 227.- PANTHONG, A.; TASSANEE-YAKUL, W.; KANJANAPOTHI, D.- "Antiinflammatory activity of 5,7 dimethoxyflavone". *Planta Med.* 55(2):123, 1989.
- 228.- PAPANOV, G.Y.; MALAKOV, P.Y.- "Clerodane diterpenoids from *Teucrium montanum* subsp. *skorpilii*". *Phytochemistry* 22(12):2787-2789, 1983.
- 229.- PAPANOV, G.Y.; MALAKOV, P.Y.- "Furanoid diterpenes in the bitter fraction of *Teucrium chamaedrys* L.". *Z. Naturforsch.* 35b:764-766, 1980.
- 230.- PAPANOV, G.Y.; MALAKOV, P.Y.- "6 β -hydroxyteuscordin and 2 β ,6 β -dihydroxyteuscordin. Two new diterpenoids from *Teucrium scordium* L.". *Z. Naturforsch.* 37b:519-520, 1982.
- 231.- PAPANOV, G.Y.; MALAKOV, P.Y.- "New furanoid diterpenes from *Teucrium scordium*". *Z. Naturforsch.* 36b(1):112-113, 1981.
-

-
- 232.- PAPANOV, G.Y.; MALAKOV, P.Y.- "2-keto-19-hydroxyteuscordin, a neo-clerodane diterpene from *Teucrium scordium*". *Phytochemistry* 24(2):297-299, 1985.
- 233.- PAPANOV, G.Y.; MALAKOV, P.Y.; BOHLMANN, F.- "Teuscordinon, a furanoid diterpene from *Teucrium scordium*". *Phytochemistry* 20:170-171, 1981.
- 234.- PARIS, R.R.; MOYSE, M.- "*Precis de Matière Médicale*", Vol. III. Ed. Masson. Paris. p. 64-87, 285, 294-295, 1970.
- 235.- PARIS, R.; NOTHIS, A.- "*Sur Quelques Plantes Pratiques d'essai des Drogues Vegetales*", Ed. Masson et Cie. Paris. p. 40-129, 1965.
- 236.- PARKER, C.W.- "5-Lipoxygenase, leukotrienes, and regulation of inflammatory responses". *Drug, Dev, Res*, 10:277-293, 1987.
- 237.- PASCUAL, C.; FERNÁNDEZ, P.; GARCÍA-ÁLVAREZ, M.C.; MARCO, J.L.; FERNÁNDEZ-GADEA, F.; TORRE, M.C. de la; HUESO-RODRÍGUEZ, J.A.; RODRÍGUEZ, B.; BRUNO, M.; PATERNOSTRO, M.P.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.- "The C-12 and C-20 configurations of some neo-clerodane diterpenoids isolated from *Teucrium* species". *Phytochemistry* 25(3):715-718, 1986.
- 238.- PAU, C.- "Formas nuevas de plantas". *Bol. Soc. Aragonesa de Ciencias Naturales* 1(2):30, 1902.
- 239.- PAUWELS, A.; THIÉRMAN-DUFFAUD, D.; AZANOWSKY, J.M.; LOISEAU, D.; BOUR, M.; LEVY, V.G.- "Wild germander hepatitis. Hepatotoxicity of herbal remedies. Two cases". *Gastroenterol, Clin. Biol.* 16(1):92-95, 1992.
- 240.- PEARSON, C.M.- "Development of arthritis, peri-arthritis and periositis in rats given adjuvant". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91:95-101, 1956.
- 241.- PEDREGAL, C.; AVENDAÑO, C.- "*Los Métodos Espectroscópicos en el Análisis de Fármacos*". Cap. 29 en AVENDAÑO, C.- "*Introducción a la Química Farmacéutica*", Ed. Interamericana McGraw Hill. Madrid. p. 944-948, 1993.
- 242.- PÉREZ, R.M.- "*Epidemiología de la Úlcera Péptica Gastroduodenal*", Cap. 18 en RODÉS, J.; PIQUÉ, J.M.- "*Patología de la Secreción Gástrica. Úlcera Péptica Gastroduodenal*", Ed. Doyma. Barcelona. p. 135-138, 1991.
- 243.- PERROT, E.; PARIS, R.- "*Les Plantes Médicinales*". Ed. Presses Universitaires de France. Paris. p. 31, 1971.
-

-
- 244.- PIOZZI, F.- "The diterpenoids of *Teucrium* species". *Heterocycles* 15(2):1489-1503, 1981.
- 245.- PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.- "Advances in the chemistry of the furanoditerpenoids from *Teucrium* species". *Heterocycles* 25(1):807- 841, 1987.
- 246.- PIQUÉ, J.M.- "Prevención de la Recidiva Ulcerosa", Cap. 23 en RODÉS, J.; PIQUÉ, J.M.- "Patología de la Secreción Gástrica, Úlcera Péptica Gastroduodenal", Ed. Doyma, Barcelona, p. 205-210, 1991.
- 247.- POOTS, B.C.M.; FAULKNER, D.J.- "Phospholipase A₂ inhibitors from marine organisms", *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 55(12):1701-1717, 1992.
- 248.- PRYOR, W.A.- "Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging". *Ann. NY Acad. Sci.* 393:1-30, 1982.
- 249.- RAINOVA, L.; NAKOV, N.; BOGDANOVA, S.; MINKOV, E.; STANEVA-STOICHEVA, D.- "Ulceroprotective activity of the flavonoids of *Genista rumelica* Vel.". *Phytother. Res.* 2(3):137, 1988.
- 250.- RAMÓN, J.- "Radicales libres en clínica humana". *Tiempos Médicos*, Anuario 87:214-217, 1987.
- 251.- RECIO, M.C.; RIOS, J.L.; VILLAR, A.- "Antimicrobial activity of selected plants employed in the spanish mediterranean area. Part. II". *Phytother. Res.* 3(3):77-80, 1989.
- 252.- RIBEREAU-GAYON, P.- "Les Composes Phenoliques des Vegetaux". Ed. Dunod, Paris, p. 87, 113, 142, 173-201, 1968.
- 253.- RIHOUX, J.P.- "Mediateurs vasopermeants et inflammation". *Angelologie* 43(3):67-74, 1991.
- 254.- RIOS, J.L.; SIMEON, S.; JIMÉNEZ, F.J.; ZAFRA-POLO, M.C.; VILLAR, A.- "Reagents for screening medicinal plants by thin-layer chromatography". *Fitoterapia* 57:153-162, 1986.
- 255.- RIZK, A.M.; HAMMOUDA, F.M.; RIMPLER, H.; KAMEL, A.- "Iridoids and flavonoids of *Teucrium polium* Herb.". *Planta Med.* 52(2):87-88, 1986.
- 256.- ROBERT, A.- "Mild irritants prevent gastric necrosis trough adaptative cytoprotection mediated by prostaglandins". *Am. J. Physiol.* 245(G):113-121, 1983.
-

-
- 257.- ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J.- "Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury". *Gastroenterology* 77:433-443, 1979.
- 258.- ROCH-ARVEILLER, M.; REVELANT, V.; PHAM HUY, D.; MAMAN, L.; FONTAGNE, J.; SORENSON, J.R.J.; GIROUD, J.P.- "Effects of some non-steroidal anti-inflammatory drug copper complexes on polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism". *Agents Actions* 31(1/2):65-71, 1990.
- 259.- RODRÍGUEZ, M.C.; BARLUENGA, J.; PASCUAL, C.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium chamaedrys*: the identity of teucrin B with dihydroteugin". *Phytochemistry* 23(12):2960-2961, 1984.
- 260.- RODRÍGUEZ, M.C.; BARLUENGA, J.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.; SERVETTAZ, O.; RODRÍGUEZ, B.- "Isoteuflidin, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium chamaedrys*, and revised structures of teucrins F and G". *Phytochemistry* 23(7):1465-1469, 1984.
- 261.- ROMBI, M.- "100 Plantes Medicinales. Composition, Mode D'action et Interet Therapeutique", Ed. Romart. Bergamo. p. 122-123, 1991.
- 262.- ROMERO, J.J.; LICHTENBERGER, L.M.- "Sterol-dependence of gastric protective activity of unsaturated phospholipids". *Dig. Dis. Sci.* 35(10): 1231-1238, 1990.
- 263.- ROSA, M. di- "Biological properties of carrageenan", *J. Pharm. Pharmac.* 24:89-102, 1972.
- 264.- ROSA, M. di; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A.- "Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine". *J. Phat.* 104:15-29, 1971.
- 265.- ROSA, M. di; WILLOUGHBY, D.A.- "Screens for antiinflammatory drugs". *J. Pharm. Pharmac.* 23:297-298, 1971.
- 266.- ROTH, S.H.- "Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy". *Arch. Intern. Med.* 146:1075-1076, 1986.
- 267.- RUNE, S.J.; VESTERGAARD, B.F.- "Ig A antibodies to herpes simplex virus type 1 in duodenal juice and saliva from patients with peptic ulcer and non ulcer subjects". *Gastroenterology* 88:1290, 1983.
-

-
- 268.- RYDNING, A.; BERSTAD, A.- "Dietary fiber and peptic ulcer", *Scand. J. Gastroenterol.* 21:1-5, 1986.
- 269.- SABISTON, D.C.- "Tratado de Patología Quirúrgica de Davis-Christopher ", Tomo I. (7ª ed.) Ed. Interamericana. México. p. 879-895, 1980.
- 270.- SAINZ, R.; MONTORO, M.; GOMOLLÓN, F.- "Úlcera Duodenal", Cap. 57 en VILARDELL, F.; PAJARES, J.M.; PÉREZ-MOTA, A.; MORENO GONZÁLEZ, E.- "Enfermedades Digestivas", Tomo I. "Generalidades, Esófago, Estómago y Duodeno". Ed. Cea. Madrid. p. 721-744, 1990.
- 271.- SALIM, A.S.- "A possible new approach to the problem of refractory peptic ulceration. A role for free radical scavengers?" *Scott. Med. J.* 36(1):19-20, 1991.
- 272.- SALIM, A.S.- "Allopurinol and dimethyl sulfoxide improve treatment outcomes in smokers with peptic ulcer disease". *J. Lab. Clin. Med.* 119(6):702-709, 1992.
- 273.- SALMON, J.A.; HIGGS, G.- "Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators". *British Med. Bull.* 42(2):285-296, 1987.
- 274.- SAMUELSSON, B.; DAHLÉN, S-E.; LINDGREN, J.A.; ROUZER, C.A.; SERHAN, C.N.- "Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects". *Science* 237:1171-1175, 1987.
- 275.- SAMUELSSON, B.- "An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes". *Drugs* 33(suppl.1):2-9, 1987.
- 276.- SANTOS RUIZ, A.; CABEZAS, J.A.; ILLAR, V.- "Tratado de Bioquímica". Vol I. Ed. Augusta S.A. Barcelona. p. 82, 1977.
- 277.- SAVIN, K.; IVANIC, R.; KILIBARDA, V.; RALIC, J.; DJNIDJEVIC, G.; KOVACEVIC, N.- "A comparative analysis of some *Teucrium* species". *Arch. Farm.* 38(1-2):7-12, 1988.
- 278.- SAVONA, G.; BRUNO, M.; PIOZZI, F.; SERVETTAZ, O.; RODRIGUEZ, B.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium massiliense*". *Phytochemistry* 23(4):849-852, 1984.
- 279.- SAVONA, G.; GARCÍA-ÁLVAREZ, M.C.; RODRIGUEZ, B.- "Dihydroteugin, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium chamaedrys*". *Phytochemistry* 21:721-723, 1982.
-

-
- 280.- SAVONA, G.; PASSANNANTI, S.; PATERNOSTRO, M.P.; PIOZZI, F.; HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; SIVERNS, M.- "Two new diterpenoids from *Teucrium fruticans*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*(9):356-359, 1978.
- 281.- SAVONA, G.; PASSANNANTI, S.; PATERNOSTRO, M.P.; PIOZZI, F.; HANSON, J.R.; SIVERNS, M.- "8 β -hydroxyfruticolone, a diterpenoid from *Teucrium fruticans*". *Phytochemistry* 17:320-322, 1978.
- 282.- SAVONA, G.; PATERNOSTRO, M.P.; PIOZZI, F.; HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; THOMAS, S.A.- "Teuflidin, a norclerodane diterpenoid from *Teucrium flavum*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*(4):1080-1083, 1978.
- 283.- SAVONA, G.; PATERNOSTRO, M.P.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.- "New clerodane diterpenoids from *Teucrium spinosum* L.". *Heterocycles* 14(2):193-195, 1980.
- 284.- SAVONA, G.; PATERNOSTRO, M.P.; PIOZZI, F.; HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; THOMAS, S.A.- "The structure of teuflin, a diterpenoid from *Teucrium flavum*; X-Ray crystallographic and spectroscopic determination". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*(7):1915-1917, 1979.
- 285.- SAVONA, G.; PIOZZI, F.; BRUNO, M.; DOMÍNGUEZ, G.; RODRÍGUEZ, B.; SERVETTAZ, O.- "Teucretol, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium creticum*". *Phytochemistry* 26(12):3285-3288, 1987.
- 286.- SAVONA, G.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; FERNÁNDEZ-GADEA, F.; MARTÍN-LOMAS, M.- "A neo-clerodane glucoside and neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium flavum* subsp. *glaucum*". *Phytochemistry* 23(4):843-848, 1984.
- 287.- SAVONA, G.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; PASCUAL, C.; SERVETTAZ, O.- "2 β -hydroxyteucvidin from *Teucrium webbianum*". *Phytochemistry* 25(12):2857-2860, 1986.
- 288.- SAVONA, G.; PIOZZI, F.; SERVETTAZ, O.; FERNÁNDEZ-GADEA, F.; RODRÍGUEZ, B.- "Teumarin, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium marum*". *Phytochemistry* 23(3):611-613, 1984.
- 289.- SAVONA, G.; PIOZZI, F.; SERVETTAZ, O.; RODRÍGUEZ, B.; HUESO-RODRÍGUEZ, J.A.; TORRE, M.C. de la- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium lepiccephalum* and *Teucrium buxifolium*". *Phytochemistry* 25(11):2569-2572, 1986.
- 290.- SAVONA, G.; PIOZZI, F.; TORRE, M.C. de la; SERVETTAZ, O.; RODRÍGUEZ, B.- "A valencane sesquiterpenoid from *Teucrium caroliipau*". *Phytochemistry* 26(2): 571-572, 1987.
-

-
- 291.- SCHAUENBERG, P.; PARIS, F.- "Guía de las Plantas Medicinales". (2ª ed.) Ed. Omega, Barcelona, p. 316, 1977.
- 292.- SCHREBER, J.C.D.- "*Plantarum Verticillatarum Unilabiatarum. Genera et Species*". Lipsiae, 1774.
- 293.- SENER, B.; BINGOL, F.- "Screening of natural sources for antiinflammatory activity (Review)". *Int. J. Crude. Drug Res.* 26(4):197-207, 1988.
- 294.- SEXMERO, M.S.; TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.; BRUNO, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium oxylepis* subsp. *marianum*". *Phytochemistry* 30(12):4079-4082, 1991.
- 295.- SEXMERO-CUADRADO, M.J.; BRUNO, M.; TORRE, M.C. de la; PIOZZI, F.; SAVONA, G.; RODRÍGUEZ, B.- "Rearranged abietane diterpenoids from the root of two *Teucrium* species". *Phytochemistry* 31(5):1967-1701, 1992.
- 296.- SHANAHAN, P.; BORRO, A.; O'GARA, F.; GLENNON, J.D.- Isolation, trace enrichment and liquid chromatographic analysis of diacetylphloroglucinol in culture and soil samples using UV and amperometric detection". *J. Chromatogr.* 606(2):171-177, 1992.
- 297.- SHEHAB, A.S.- "Cytological effects of medicinal plants in Qatar II. Mitotic effect of water extract of *Teucrium pillosum* on *Allium cepa*". *Cytologia (Tokyo)* 45(1-2):57-64, 1980.
- 298.- SHEN, X.; TAN, Z.; SUN, H.- "The chemical constituents of *Teucrium queadriparium*". *Yunnan Zhiwu Yanjiu* 12(2):229-230, 1990. C.A. 3485v.
- 299.- SILVESTRI, B.- "Animal models for the study of atypical anti-inflammatory agents". *Agents Actions* 17(3/4):329-337, 1985.
- 300.- SIMOES, F.; RODRÍGUEZ, B.; BRUNO, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, F.; ARNOLD, N.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium kotschyannum*". *Phytochemistry* 28(10):2763-2768, 1989.
- 301.- SIMOES, F.; RODRÍGUEZ, B.; PIOZZI, F.; SAVONA, F.; BRUNO, M.; ARNOLD, N.- "Isoteucrin H₄, a 19-norneoclerodane diterpenoid of biogenetic interest from *Teucrium kotschyannum*". *Heterocycles* 28(1):111-115, 1989.
-

-
- 302.- SIMMONDS, M.S.J.; BLANEY, W.M.; LEY, S.; SAVONA, G.; BRUNO, M.; RODRIGUEZ, B.- "The antifeedant activity of clerodane diterpenoids from *Teucrium*". *Phytochemistry* 28(4):1069-1071, 1989.
- 303.- SLATER, T.F.- "Free-radical mechanisms in tissue injury". *Biochem. J.* 222:1-15, 1984.
- 304.- SNYDER, L.R.- "Classification of the solvent properties of common liquids". *J. Chromatogr.* 92:223-230, 1974.
- 305.- SNYDER, L.R.- "Classification of the solvent properties of common liquids". *J. Chromatogr. Sci.* 16:223-234, 1978.
- 306.- SODEMAN, A.; SODEMAN, T.- "*Fisopatología Clínica*". (6ª ed.) Ed. Interamericana. México. p. 876-884, 1983.
- 307.- SOLDATO, P. del; FOSCHI, D.; VARIN, L.; DANIOTTI, S.- "Comparison of the gastric cytoprotective properties of atropine, ranitidine and PGE₂ in rats". *European J. Pharmacol.* 106:53-58, 1985.
- 308.- SONNENBER, A.- "Dietary salt and gastric ulcer". *Gut* 27:1138-1142, 1986.
- 309.- SOUTHRN, P.A.; POWIS, G.- "Free radicals in Medicine. II. Involvement in human disease". *Mayo Clin Proc.* 63:390-408, 1988.
- 310.- SPILLERT, R.; SPILLERT, K.R.; HOLLINSHEAD, M.B.; LAZARO, E.J.- "Inhibitory effect of high dose ascorbic acid on inflammatory edema". *Agents Actions* 27(3/4):401-402, 1989.
- 311.- SRINIVASAN, S.- "Effects of some flavonoids on the surface charge characteristic of the vascular system and their antithrombogenic characteristics". *Microcirculation* 6:394, 1962.
- 312.- STAHL, E.- "*Thin-Layer Chromatography*". Ed. Springer-Verlag. Berlín. p. 202, 65-88, 1969.
- 313.- STILL, W.C.; KAHN, M.; MITRA, A.- "Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution". *J. Org. Chem.* 43(14):2923-2925, 1978.
- 314.- STREITWIESER, A.; HEATHCOCK, C.H.- "*Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear*". Cap. 10 en "*Química Orgánica*". Ed. Interamericana. México. p. 169-187, 1985.
-

-
- 315.- SUGISHITA, E.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y.- "Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats". *J. Pharm. Dyn.* 4:565-575, 1981.
- 316.- SULEIMAN, M.S.; ABDUL-GHANI, A.S.; AL-KHALIL, S.; AMIN, R.- "Effect of *Teucrium polium* boiled leaf extract on intestinal motility and blood pressure". *J. Ethnopharmacol.* 22(1):111-6, 1988.
- 317.- SUN, D.; LI, G.- "Teupernin A, B and C, three ent-clerodane diterpenoids from *Teucrium pernyi* Franch.". *Chin. Chem. Lett.* 2(7):539-542, 1991. C.A. 191089g.
- 318.- SUN, D.; LI, G.- "Teupernin D, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium pernyi*". *Phytochemistry* 33(3):716-717, 1993.
- 319.- SUN, H.; CHEN, X.; WANG, T.; PAN, L.; LIN, A.; CHEN, D.- "A neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium bidentatum*". *Phytochemistry* 30(5):1721-1723, 1991.
- 320.- SZABO, S.- "Mechanism of mucosal injury in the stomach and duodenum: Time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies". *Scand. J. Gastroenterol.* 22(suppl. 127):21-28, 1987.
- 321.- SZABO, S.- "Mechanisms of gastric mucosal injury and protection". *J. Clin. Gastroenterol.* 13(suppl. 2):s21-s34, 1991.
- 322.- SZABO, S.; GOLDBERG, I.- "Experimental pathogenesis: drugs and chemical lesions in the gastric mucosa". *Scand. J. Gastroenterol.* 25(suppl. 174):1-8, 1990.
- 323.- SZABO, S.; TRIER, J.S.; BROWN, A.; SCHNOOR, Jr. J.- "Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat". *Gastroenterology* 88:228-236, 1985.
- 324.- SZABO, S.; TRIER, J.S.; FRANKEL, P.W.- "Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection". *Science* 214:200-202, 1981.
- 325.- TAKAHASHI, S.; KURUBAYASHI, M.; KITAZAWA, E.; HARUYAMA, H.; OGISO, A.- "Plaunolide, a furanoid diterpene from *Croton sublyratus*". *Phytochemistry* 22(1):302-303, 1983.
- 326.- TAKEUCHI, K.; UESHIMA, K.; HORONAKA, Y.; FUJIOKA, Y.; MATSUMOTO, J.; OKABE, S.- "Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. Relation to gastric hypermotility". *Digestion* 49(3):175-184, 1991.
-

-
- 327.- TARIQ, M.; AGEEL, A. M.; AL-YAHYA, M.A.; MOSSA, J.S.; AL-SAID, M.S.- "Antiinflammatory activity of *Teucrium polium*". *Int. J. Tissue React.* 11(4):185-188, 1989.
- 328.- TATSUNO, I.; SAITO, H.; CHANG, K.J.; TAMURA, Y.; YOSHIDA, S.- "Comparison of the effect between leukotriene B₄ and LTB₅ on the induction of interleukin 1-like activity and calcium mobilizing activity in human blood monocytes". *Agents Actions* 29:324-327, 1990.
- 329.- TAYLOR, G.W.; MORRIS, H.R.- "Lipoxygenase pathways". *British Med. Bull.* 39(3):219-222, 1983.
- 330.- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I.; FERRERES, T.F.- "Flavonoid aglycones and glycosides from *Teucrium gnaphalodes*". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 48(5):859-860, 1985.
- 331.- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GRAYER-BARKMEIJER, R.J.; GIL, M.I.; HARBORNE, J.B.- "Distribution of 6-methoxy- and 8-hydroxyflavone glycosides in the *Labiatae*, the *Scrophulariaceae* and related families". *Phytochemistry* 27(8):2631-2645, 1988.
- 332.- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; LÓPEZ-GÓMEZ, C.; VILLAR, A.; TOMÁS-LORENTE, F.- "Inhibition of lens aldose reductase by *Labiatae* flavonoids". *Planta Med.* 52(3):239-240, 1986.
- 333.- TORRE, M.C. de la; BRUNO, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.; OMAR, A.A.; PERALES, A.; RODRÍGUEZ, B.- "Two neo-clerodane diterpenoids containing an unusual 2,6-dioxabicyclo [2.2.1.] heptane structural moiety". *Tetrahedron* 47(20-21):3463-3470, 1991.
- 334.- TORRE, M.C. de la; BRUNO, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.; RODRÍGUEZ, B.; OMAR, A.A.- "Teucrolivins D-F, neo-clerodanes derivatives from *Teucrium oliverianum*". *Phytochemistry* 30(5):1603-1606, 1991.
- 335.- TORRE, M.C. de la; BRUNO, M.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.; RODRÍGUEZ, B.; SERVETTAZ, O.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium pestalozzae*, *Teucrium odontites* and *Teucrium microphyllum*". *Phytochemistry* 29(3):988-989, 1990.
- 336.- TORRE, M.C. de la; EZER, N.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.; SERVETTAZ, O.- "Neo-clerodane diterpenoids, flavonoids and other constituents from some *Teucrium* species". *Fitoterapia* 59(1):70-72, 1988.
- 337.- TORRE, M.C. de la; FERNÁNDEZ-GADEA, F.; MICHAVILA, A.; RODRÍGUEZ, B.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium botrys*". *Phytochemistry* 25(10):2385-2388, 1986.
-

-
- 338.- TORRE, M.C. de la; FERNÁNDEZ, P.; RODRÍGUEZ, B.- "Thermal rearrangements of some neo-clerodane diterpenoids". *Tetrahedron* 43(20):4679-4684, 1987.
- 339.- TORRE, M.C. de la; PASCUAL, C.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.; PERALES, A.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium salviastrum*". *Phytochemistry* 25(6):1397-1403, 1986.
- 340.- TORRE, M.C. de la; PIOZZI, F.; RIZK, A.F.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.- "19-acetyltheupolin IV, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium polium* subsp. *pilosum*". *Phytochemistry* 25(9):2239-2240, 1986.
- 341.- TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.; BRUNO, M.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.; PERALES, A.; TORRES, M.R.; SERVETTAZ, O.- "Two C-10 oxygenated neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium pestalozzae*". *Phytochemistry* 29(7):2229-2233, 1990.
- 342.- TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.; BRUNO, M.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.; SERVETTAZ, O.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium micropodioides*". *Phytochemistry* 27(1):213-216, 1988.
- 343.- TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.; PIOZZI, F.; SAVONA, G.; BRUNO, M.; CARREIRAS, M.C.- "Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium abutilioides*". *Phytochemistry* 29(2):579-584, 1990.
- 344.- TORRE, M.C. de la; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G.; PIOZZI, F.- "Teugnaphalodin, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium gnaphalodes*". *Phytochemistry* 25(1):171-174, 1986.
- 345.- TUTIN, T.G.; HEYWOOD, V.H.; BURGESS, N.A.; MOORE, D.M.; VALENTINE, D.H.; WALTERS, S.M.; WEBB, D.A.- "*Flora Europaea*". Vol 3. "*Diapensiaceae to Myoporaceae*", Ed. Cambridge at The University Press. p. 129-135, 1972.
- 346.- ULUBELEN, A.; TOPCU, G.- "New abietane diterpenoids from *Salvia montbretii*". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 55(4):432-444, 1992.
- 347.- VAANANEN, P.M.; MEDDINGS, J.B.; WALLACE, J.L.- "Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury". *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 261(3):470-475, 1991.
- 348.- VANE, J.- "The evolution of non-steroidal antiinflammatory drugs and their mechanisms of action". *Drugs* 33(suppl. 1):18-27, 1987.
-

- 349.- VANE, J.R.- "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs". *Nature New Biology* 231:232-237, 1971.
- 350.- VAPAATALO, H.- "Free radicals and antiinflammatory drugs". *Med. Biol.* 64:1-7, 1986.
- 351.- VELASCO-NEGUERUELA, A.; PÉREZ-ALONSO, M.J.- "Volatile oils of *Teucrium* species endemic to Spain I. *Teucrium lusitanicum* subsp. *aureiformis*". *Anales de Bromatología* 41(2):241-248, 1989.
- 352.- VELASCO-NEGUERUELA, A.; PÉREZ-ALONSO, M.J.- "The volatiles of six *Teucrium* species from the Iberian Peninsula and the balearic Islands". *Phytochemistry* 29(4):1165-1169, 1990.
- 353.- VERYKOKIDOU-VITSAROPOULOU, E.; VAJIAS, K.- "Sur les aglycones flavoniques de *Teucrium polium* L.". *Plant. Méd. Phytothér.* 20(2):109-114, 1986.
- 354.- VERYKOKIDOU-VITSAROPOULOU, E.; VAJIAS, K.- "Methylated flavones from *Teucrium polium*". *Planta Med.* 5:401-402, 1986.
- 355.- VIGNEAU, C.- "*Plantes Médicinales: Thérapeutique-Toxicité*". Ed. Collection de Médecine légale et de toxicologie Médicale, n° 129, p. 71. Paris, 1985.
- 356.- VILARDELL, F.- "*Úlcera Gástrica*". Cap. 56 en VILARDELL, F.; PAJARES, J.M.; PÉREZ-MOTA, A.; MORENO GONZÁLEZ, E.- "*Enfermedades Digestivas*". Tomo I. "*Generalidades, Esófago, Estómago y Duodeno*". Ed. Cea. Madrid. p. 697-719, 1990.
- 357.- VILLAR, A.; ALCARAZ, M.J.- "Effect of borjatriol on nystatin oedema". *Pharmazie (Berlin)* 39H:278-279, 1984.
- 358.- VILLAR, A.; ESPLUGUES, J.; ALCARAZ, M.J.- "Acute antiinflammatory activity of *Sideritis mugronensis* flavonoid". *Arch. Pharmacol. Toxicol.* 8:99-106, 1981.
- 359.- VILLAR, A.; ESPLUGUES, J.; ALCARAZ, M.J.- "Activité pharmacodynamique de *Sideritis mugronensis* III. Etude de l'inflammation aigue. Activité antiulcéreuse". *Plant. Méd. Phytothér.* 16:157-162, 1982.
- 360.- VILLAR, A.; GASCÓ, M.A.; ALCARAZ, M.J.- "Antiinflammatory and antiulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid". *J. Pharm. Pharmacol.* 36:820-823, 1984.
-

-
- 361.- VILLAR, A.; GASCÓ, M.A.; ALCARAZ, M.J.- "Effect of hypolaetin-8-glucoside on human platelet aggregation induced by ADP". *Planta Med.* 51:455-456, 1985.
- 362.- VILLAR, A.; GASCÓ, M.A.; ALCARAZ, M.J.- "Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation". *J. Pharm. Pharmacol.* 39:S02-S07, 1987.
- 363.- VILLAR, A.; GASCÓ, M.A.; ALCARAZ, M.J.; MANÉZ, S.; CORTES, D.- "Hypolaetin-8-O-glucoside an antiinflammatory flavonoid from *Sideritis mugronensis*". *Planta Med.* 51:70, 1985.
- 364.- VILLAR, A.; JIMÉNEZ, M.J.; ALCARAZ, M.J.- "The antiinflammatory activity of the genus *Sideritis*: a new insight". *Plant. Méd. Phytothér.* 20(1):31-36, 1986.
- 365.- VILLAR, A.; RIOS, J.L.; SIMEON, S.; ZAFRA-POLO, M.C.- "New reagent for the detection of sesquiterpene lactones by thin-layer chromatography". *J. Chromatogr.* 303:306-308, 1984.
- 366.- VILLAR, A.; SALOM, R.; ALCARAZ, M.J.- "An approach to the antiinflammatory activity of borjatriol". *Planta Med.* 1:90-92, 1982.
- 367.- VILLAR, A.; SALOM, R.; ALCARAZ, M.J.- "Effect of borjatriol on established adjuvant arthritis". *Pharmazie (Berlin)* 38H:566, 1983.
- 368.- VILLAR, A.; VALVERDE, S.; HERAS, B. de las; VIVAS, J.M.- "A manoyl oxide diterpenoid from *Sideritis javalambrensis*". *Phytochemistry* 34(2):575, 1993.
- 369.- VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R.; VENABLE, A.L.; MCKENZIE, K.K.- "Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat". *Fed. Prod.* 46:118-126, 1987.
- 370.- VOKOU, D.; BESSIERE, J.M.- "Volatile constituents of *Teucrium polium*". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 48(3):498-499, 1985.
- 371.- VUORELA, H.; LEHTONEN, P.; HILTUNEN, R.- "Optimization of HPLC analysis of biogenic amines with reference to molecular structure". *J. Liq. Chromatogr.* 14(16-17):3181-3195, 1991.
- 372.- WALLACE, J.L.; ARFORS, K.E.; MCKNIGHT, G.W.- "A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit". *Gastroenterology* 100(4):878-883, 1991.
-

-
- 373.- WALSH, J.H.- "*Transtornos Ácido-Pépticos del Tracto Gastrointestinal*". Cap. 77 en KELLEX, W.N.- "*Medicina Interna*". Tomo I. Ed. Panamericana. Buenos Aires. p. 521-535, 1990.
- 374.- WALZ, D.T.- "Investigation of the carrageenan induced rat paw edema assay and correlation between". *Arch. Int. Pharmacodyn.* 185:337, 1970.
- 375.- WATTIEZ, N.; STERNON, F.- "*Elements de Chimie Vegetale*". Ed. Masson et Cie. Paris. p. 343, 362, 401, 426, 553, 651, 1942.
- 376.- WEISSMANN, G.- "La aspirina". *Investigación y Ciencia* 174:62-69, 1991.
- 377.- WHITEHOUSE, M.W.- "Adjuvant-Induced Polyarthrititis in Rats" en GREENWALD, R.A.; DIAMOND, H.S.- "*Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases*". Vol I. Ed. CRC Press. Florida. p. 3-16, 1988.
- 378.- WILKERSON, W.W.- "Antiinflammatory phospholipase A₂ inhibitors". *Drugs of Future* 15:139-148, 1990.
- 379.- WILKINSON, S.E.; WADSWORTH, J.- "Second messengers in inflammation". *Agents Actions* 35:208-211, 1992.
- 380.- WILLIAMS, K.I.; HIGGS, G.A.- "Eicosanoids and inflammation". *J. Pathol.* 156:101-110, 1988.
- 381.- WILLIAMS, T.J.- "Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation". *British Med. Bull.* 39(3):239-242, 1983.
- 382.- WILLIAMS, T.J.; MORLEY, J.- "Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation". *Nature* 246:215-217, 1973.
- 383.- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.- "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111:544-547, 1962.
- 384.- WOLDE, T.S.; BREEDVELD, P.C.; VRIES, R.R.P.; D'AMARO, J.; RUBENSTEIN, P.; SCHREUDER, G.M.Th.; CLAAS, F.H.J.; ROOD, J.J. van - "Influence of non-inherited maternal HLA antigens on occurrence of rheumatoid arthritis". *Lancet* 341:200-202, 1993.
-

-
- 385.- XIE, N.; MIN, Z.; ZHAO, S.; LU, Y.; ZHENG, Q.; WANG, C.- "Teupernin D: a chlorine-containing *neo-clerodane* diterpene from *Teucrium pernyi*". *Chin. Chem. Lett.* 2(11):845-846, 1991. C.A. 170232h.
- 386.- XIE, N.; MIN, Z.; ZHAO, S.; LU, Y.; ZHENG, Q.; WANG, C.; MIZUNO, M.; IINUMA, M.; TANAKA, T.- "A chlorine-containing *neo-clerodane* diterpene from *Teucrium pernyi*". *Chem. Pharm. Bull.* 40(8):2193-2195, 1992.
- 387.- XIE, N.; MIN, Z.; ZHAO, S.; WU, B.; ZHENG, Q.; ZHANG, P.- "*Neo-clerodane* diterpenoids from *Teucrium pernyi*". *Phytochemistry* 30(6):1963-1966, 1991.
- 388.- YANIV, Z.; DAFNI, A.; FRIEDMAN, J.; PALEVITCH, D.- "Plants used for the treatment of Diabetes in Israel". *J. Ethnopharmacol.* 19(2):145-151, 1987.
- 389.- YESILADA, E.; SEZIK, E.- "Screening of some turkish medicinal plants used in the treatment of Rheumatoid Arthritis and inflammatory diseases for their antiinflammatory activity". *Planta Med.* 56:659, 1990.
- 390.- ZAFRA-POLO, M.C.; BLAZQUEZ, M.A.- "Antiinflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Artemisia barrelieri* in rats". *Phytother. Res.* 5(2):91-93, 1991.
- 391.- ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K.T.- "Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents". *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 55(7):999-1003, 1992.
- 392.- ZOOG, G.C.; NYIREDY, Sz.; STICHER, O.- "Operating conditions in preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC). I. Influence of column preparation and particle size of silica". *J. Liq. Chromatogr.* 12(11):2031-2048, 1989.
- 393.- ZOOG, G.C.; NYIREDY, Sz.; STICHER, O.- "Operating conditions in preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC). II. Influence of solvent strength and flow rate of the mobile phase, capacity and dimensions of the column". *J. Liq. Chromatogr.* 12(11):2049-2065, 1989.
-

APÉNDICE I: OBRAS DE FRECUENTE CONSULTA

- 1.- BOWMAN, W.C.; RAND, M.J.- "*Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas*", (2ª ed.) Ed. Interamericana, México, 1985.
- 2.- BRUNETON, J.- "*Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*", Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, 1991.
- 3.- CLAUS, E.P.- "*Laboratory Manual for Pharmacognosy*, (2ª ed.) Ed. The C. V. Mosby Company. St. Lucis, 1950.
- 4.- CLAUS, E.P.; TYLER, V.E.- "*Farmacognosia*", (5ª ed.) Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 1968.
- 5.- CRAIG, C.R.; STITZEL, R.- "*Farmacología Médica*". Ed. Interamericana, México, 1984.
- 6.- CRONWELL, B.T.- "*The Alkaloids. Moderne Methoden der Pflanzenanlyse*", Vol. IV. Ed. Springer-Verlag. Berlin, 1955.
- 7.- DEVON, T.K.; SCOTT, A.I.- "*Handbook of Naturally Occurring Compounds*", Vol. II, "*Terpenes*". Ed. Academic Press. New York, 1972.
- 8.- DEY, M.P.; HARBORNE, J.B.- "*Methods in plant biochemistry*", Vol. 7, "*Terpenoids*". Ed. Academic Press. London, 1991.
- 9.- EVANS, W. Ch.- "*Farmacognosia, Trease-Evans*", (13ª ed.) Ed. Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 1991.
- 10.- FARMACOPEA OFICIAL ESPAÑOLA. Real Academia de Medicina. Ed. Estados (9ª ed.) Madrid, 1954.
- 11.- FLÓREZ, J.; ARMIJO, J.A.; MEDIAVILLA, A.- "*Farmacología Humana*", (2ª ed.) Ed. Masson Salvat Medicina. Barcelona, 1992.
- 12.- FONT QUER, P.- "*Diccionario de Botánica*", Ed. Labor. Barcelona, 1989.
- 13.- GREENWALD, R.A.; DIAMOND, H.S.- "*Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases*", Vol I. Ed. CRC Press. Florida, 1988.
- 14.- GOODMAN, A.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P.- "*Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*". (8ª ed.) Ed. Panamericana, México, 1991.

-
- 15.- GUYTON, A.- *"Tratado de Fisiología Médica"*. (7ª ed.) Ed. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, 1990.
- 16.- HARBORNE, J.B.- *"The Flavonoids: Advances in Research since 1980"*. Ed. Chapman and Hall. New York, 1988.
- 17.- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A.- *"Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Product Isolation"*. Ed. Springer-Verlag. Berlín, 1986.
- 18.- LITTER, M.- *"Farmacología Experimental y Clínica"*. (7ª ed.) Ed. El Ateneo. Buenos Aires, 1986.
- 19.- MABRY, T.J.; MARKHAN, K.R.; THOMAS, M.B.- *"The Systematic Identification of Flavonoids"*. Ed. Springer-Verlag. Berlín, 1970.
- 20.- PELLETIER, S.W.- *"Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives"*. Ed. Wiley Interscience. New York, 1983.
- 21.- PINDER, A.R.- *"The Chemistry of the Terpenes"*. Ed. Wiley. New York, 1960.
- 22.- RAINSFORD, K.D.; PATH, M.R.C.- *"Antiinflammatory and Anti-rheumatic Drugs"*. Vol. 1: *"Inflammation Mechanisms and Actions of Traditional Drugs"*. CRC Press, INC. Florida, 1985.
- 23.- RANG, H.P.; DALE, M.M.- *"Farmacología"*. Ed. Churchill Livingstone. Edimburgo, 1992.
- 24.- SAN MARTÍN, R.- *"Tratado de Farmacognosia"*. Ed. Científico Médica. Madrid, 1977.
- 25.- SIMONSEN, J.; BARTON, D.H.R.- *"The Terpenes"*. Vol. I. Ed. University Press. Cambridge, 1961.
- 26.- SIMONSEN, J.; OWEN, L.N.- *"The Terpenes"*. Vol. II. Ed. University Press. Cambridge, 1961.
- 27.- TREASE, G.E.; EVANS, W.C.- *"Tratado de Farmacognosia"*. (12ª ed.) Ed. Interamericana. Barcelona, 1986.
- 28.- VELASCO, A.; LORENZO, P.; SERRANO, J.S.; ANDRÉS-TRELLES, F.- *"Velázquez. Farmacología"*. (16ª ed.) Ed. Interamericana McGraw-Hill. New York, 1993.
- 29.- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M.- *"Plant Drug Analysis"*. Ed. Springer-Verlag. Berlín, 1984.
-

APÉNDICE II: TESIS DE LICENCIATURA Y DOCTORALES

- 1.- ABAD, M.J.- "Principios antiinflamatorios aislados de *Tanacetum microphyllum* D.C.", Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid, 1992.
- 2.- BENEDÍ, J.- "Contribución al estudio farmacognóstico y farmacodinámico del *Picnemon acarna* Cass.", Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid, 1983.
- 3.- BERMEJO, P.- "Investigación general de heterósidos en plantas a través de su hidrólisis y posterior estudio cromatográfico de azúcares", Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid, 1977.
- 4.- CARRETERO, M.E.- "Contribución al estudio farmacognóstico y farmacodinámico de la *Polygala microphylla* L.", Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid, 1983.
- 5.- HERAS, B. de las - "Farmacología de *Sideritis javalambrensis* Pau: aislamiento de nuevos principios antiinflamatorios y estudio de su actividad", Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid, 1992.
- 6.- IGLESIAS, I.- "Contribución al estudio farmacognóstico y farmacodinámico del *Onopordon acanthium* L.", Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid, 1983.
- 7.- LÓPEZ, J.L.- "Actividad antiinflamatoria de distintos extractos de *Sideritis foetens* Clem. y aislamiento de un principio activo", Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid, 1991.
- 8.- RIGUAL, A.- "Estudio de la Flora y Vegetación de la Provincia de Alicante", Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias (Sección de Biológicas). Universidad de Madrid, 1967.
- 9.- SIMEÓN, S.- "Screening fitoquímico de diversas especies de *Sideritis*", Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia, 1983.
- 10.- SLOWING, K.V.- "Estudio de la actividad antiinflamatoria de diversas especies de la flora de Guatemala", Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid, 1992.